Travail de diplôme

Coombs contrôles négatifs

Comparaison entre deux laves globules

Anne Delarze
51ème volée

École Supérieure de la Santé
Stage d'immunohématologie, UMT, BH-18 CHUV
Novembre 2011-Avril 2012
Responsable accompagnante : Mme Jocelyne Conne

Sommaire

Dans le laboratoire de l'Unité de Médecine Transfusionnelle (UMT), comme dans la plupart des laboratoires, l'utilisation d'automates pour la réalisation des tests devient de plus en plus fréquente. Les automates ont entre autre l'avantage de standardiser les méthodes. Certains tests, comme les tests de Coombs en tubes, dont il est sujet dans ce travail, sont un mixe entre « manuel » et « automate ». Ces tests pourraient être réalisés entièrement par un automate, mais l'UMT tient à garder la méthode manuelle. Le recul par rapport aux résultats obtenus par automate n'a pas été jugé assez important par rapport à celui des tests en tubes. De plus, certains tests d'immunohématologie ne pourront jamais être réalisés entièrement par automate, il est donc important de garder un savoir faire manuel.

L'automate utilisé quotidiennement pour les tests de Coombs en tubes est un lave globules. Cet automate a pour fonction de laver les globules rouges, afin d'éliminer le plasma et les protéines qu'il contient. L'étape du lavage est très importante ; si celle-ci est mal effectuée, les résultats peuvent être faussés (faux négatifs) et retarder la livraison des produits sanguins.

L'UMT possède deux laves globules de marques différentes. Bien qu'ils soient utilisés pour effectuer les mêmes tests, leurs programmations ne sont pas identiques. Ce travail de diplôme a pour but une meilleure compréhension du mode de fonctionnement de ces laves globules et de l'influence des différents paramètres de programmation afin de réduire voire éliminer les problèmes de faux négatifs et diminuer le temps de lavage. Pour cela une comparaison entre plusieurs programmations a été effectuée sur les deux laves globules en parallèle.

Abstract

In the labor of the transfusion medicine Unit (TMU), like in others, the use of automatons for tests' execution is becoming more and more common. Some tests, like Coombs in tube, as discussed in this work topic, is a mix between manual and automated test. These tests could be realized exclusively by an automaton, but the TMU tends to keep the manual technique. Indeed, retrospectively, the results obtained by automatons haven't been considered as important as the ones obtained manually/in tubes.

The automaton daily used for the combs tests in tube is a cellwashing centrifuge. As its name mentions it, the function of this machine is to wash the red cells in purpose to remove the plasma and its proteins. The washing step is very important, if this one fails the results may be skewed (false negatives) and this may delay the delivery of the blood products.

The TMU owns two cellwashing centrifuges of different brands. Although they are used to proceed the same tests, their programming is not the same. This diploma work has for objective to present a better comprehension of the operating mode of these cellwashing centrifuges and the influence of different programming parameters, in order to reduce, not to say to rule out, the false negatives problematic and to decrease the washing time. For this, a comparison between several programming has been completed on these two cellwashing centrifuges in parallel.

Mots clés

Immunohématologie
Test de Coombs en tube
Lave-globules
Automate
Manuel

Keywords

Immunohematology
Coombs in tube
Cellwashing centrifuge
Automaton
Manual

Table des matières

Sommaire....2
Abstract....2
Mots clés, Keywords....2
Présentation du laboratoire....5
Introduction....5
2.1 Rappel théorique pour la compréhension du sujet....5
2.1.1 Antigènes....5
2.1.2 Anticorps....7
2.1.3 Le complément....8
1.2 Test de Coombs direct....9
2.3 Test de Coombs indirect....9
2.4 Réactifs utilisés pour les tests de Coombs....10
2.4.1 Immusol Compact®....10
2.4.2 Enlisst-II®....11
2.4.3 Coombs serum IgG....12
2.4.4 Coombs Contrôle....13
Laves globules....14
3.1 Généralités....14
3.2 Lave-globules DiaMed....14
3.2.1 Description[12,13]....15
3.2.2 Fonctionnement....15
3.3 Lave globules Medion....16
3.3.1 Description [14]....17
3.3.2 Fonctionnement....17
3.4 Rencontre avec les représentantes Bio-rad et Medion....17
3.5 Laves globules DiaMed et Medion....17
3.5.1 Différences....17
3.5.2 Avantages et inconvénients des deux laves globules....18
Partie pratique....19
4.1 Objectifs....19
4.2 Matériel et Méthodes....19
4.2.1 Matériel....19
4.2.2 Méthodes....19

4.3 Protocoles 23
4.3.1 Coombs direct 23
4.3.2 Coombs indirect 23
4.3.3 Que faire en cas de Coombs contrôle négatif ? 24
4.4 Réactifs utilisés 24
4.4.1 DiaClon Coombs – Serum Anti-IgG, Anti-C3d 24
4.4.2 Coombs Control Girofls 24
4.4.3 Entliss-II® 24
4.4.4 Immusol® 26
4.5 Résultats des tests effectués 26
4.5.1 Forces d'agglutination 26
4.5.2 Résultats de Coombs contrôles négatifs 27
4.5.3 Résultats de Coombs contrôles positifs 30
5. Discussion des résultats 36
6. Conclusion 36
7. Remerciements 37
8. Annexes 38
8.1 Lexique 38
8.2 Annexe 1 - Protocole Coombs direct utilisé au laboratoire UMT 39
8.3 Annexe 2 - Protocole Coombs indirect utilisé au laboratoire UMT 43
8.4 Annexe 3 - Cas de Coombs contrôles négatifs répertoriés par les TAB 46
8.5 Annexe 4 – Liste des tubes donneurs 47
8.6 Annexe 5 - Résultats 49
8.7 Annexe 6 - Totalité des cas de figures de Coombs contrôle positifs 54
8.8 Annexe 7 - Paramètres Medion 55
8.8.1 Paramètres globaux [15] 55
8.8.2 Paramètres de programme [15] 55
9. Références bibliographiques 56
10. Table des illustrations 58

Présentation du laboratoire

Le laboratoire de l'UMT est situé au 18ème étage du bâtiment hospitalier principal du CHUV à Lausanne ; il fait partie du Service Régional Vaudois de Transfusion Sanguine (SRTS VD). Ce service est une fondation à but non lucratif. Il est l'un des treize services membres du Service de Transfusion Sanguine de la Croix-Rouge-Suisse (STS CRS). [1]

L'UMT s'occupe de la distribution de tous les produits sanguins du CHUV, mais aussi de demandes externes provenant d'autres hôpitaux. Le laboratoire est divisé en deux parties, les urgences et la routine. Les urgences sont ouvertes 24h sur 24 7 jours sur 7. Elles traitent les demandes urgentes, les demandes des blocs opératoires et les commandes de plaquettes et de plasma frais congelé. Le laboratoire de routine, lui, est ouvert de 7h à 15h30 les jours ouvrables et traite les analyses de routine et celles des donneurs.

L'UMT suit les recommandations de l'Association Suisse de Médecine Transfusionnelle (ASMT) et du Service de Transfusion Sanguine de la Croix Rouge Suisse (STS CRS). Swissmedic cautionne dans la totalité ces recommandations qui « décrivent les méthodes appropriées à utiliser dans le cadre du bilan prétransfusionnel afin de compatibiliser les groupes sanguins des produits sanguins labiles avec ceux du patient ». [2]

Introduction

Depuis plusieurs mois, les technicien(ne)s en analyses biomédicales (TAB) de l'UMT ont pu constater que le contrôle effectué lors des tests de Coombs en tubes n'était pas toujours positif comme il devrait l'être. Le test de Coombs est l'un des tests les plus importants d'immunohématologie, il fait partie des tests de base. L'antiglobuline contenue dans le sérum de Coombs permet de déceler la présence d'anticorps anti-érythrocytaires irréguliers ou de fractions du complément à la surface des globules rouges. La plupart des anticorps présents chez les patients sont des alloanticorps de type IgG.

En cas de Coombs contrôle négatif, les produits sanguins ne peuvent pas être délivrés. Il faut refaire le test jusqu'à l'obtention d'un contrôle positif, ce qui peut provoquer une perte de temps non négligeable. Cela retarde la libération des produits sanguins et donc la transfusion. De plus, dans certains cas, la quantité d'échantillon disponible est très faible. De se fait, si le test de Coombs doit être réalisé à plusieurs reprise, il n'y aura plus assez de matériel pour effectuer d'éventuelles analyses supplémentaires.

A l'UMT, deux tests de Coombs sont pratiqués, le test de Coombs direct et le test de Coombs indirect. Ces deux tests utilisent les mêmes réactifs, mais leur protocole respectif est quelque peu différent.

2.1 Rappel théorique pour la compréhension du sujet

2.1.1 Antigènes

Les antigènes sont constitués de protéines et d'hydrates de carbone. Ils ont la particularité de provoquer une réponse immune, puis de réagir avec le produit de cette réponse, les anticorps.

Il existe plusieurs sortes d'antigènes :

- Les hétéroantigènes (provenant d'une autre espèce)
- Les alloantigènes (provenant d'un autre individu mais de la même espèce)
- Les autoantigènes (appartenant à l'individu) [3]

2.1.2 Anticorps

Les anticorps sont les produits de la réaction immune. Ce sont des protéines (immunoglobulines), produit par les lymphocytes B suite à une exposition à des antigènes. Ils ont la capacité de se fixer spécifiquement aux antigènes (réaction réversible) et d'activer le système du complément. [4]

Les immunoglobulines se classent selon la structure de leur région constante et de leur chaîne lourde. Il existe cinq classes d'immunoglobulines différentes : les IgG, IgA, IgM, IgD et IgE. Certaines de ces classes peuvent être divisées en sous-classes. [3,4]

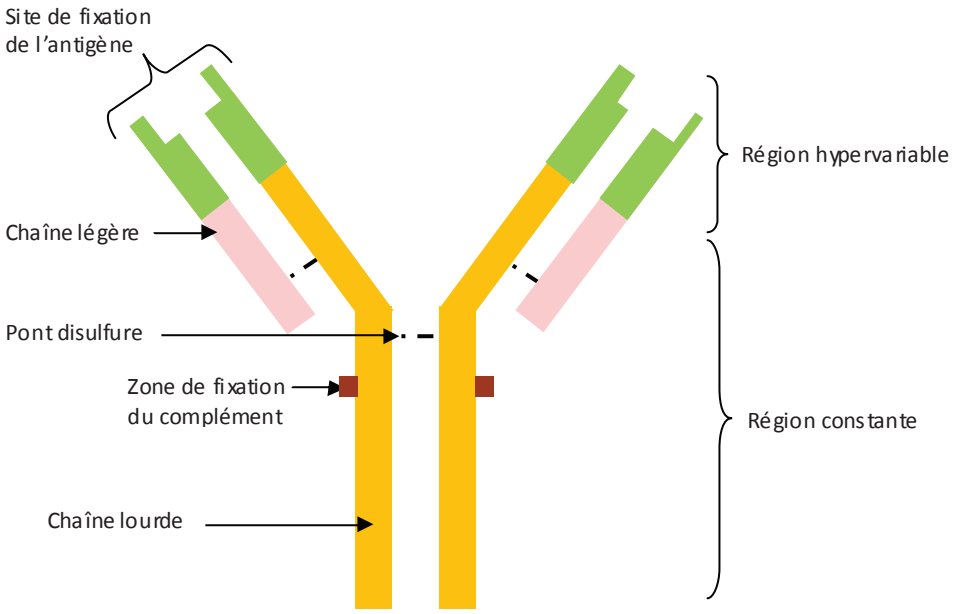

Fig.1 Immunoglobuline de type IgG

En immunohématologie, la plupart des immunoglobulines sont de type IgM ou IgG. Ces deux sortes d'anticorps ont certaines spécificités qui peuvent être importantes en immunohématologie.

2.1.2.1 Immunoglobulines de type IgM

Les IgM sont généralement des hétéroanticorps. Ce sont des anticorps froids qui se fixent sans artifice technique sur la membrane érythrocytaire et produisent une agglutination in vitro en milieu salin (NaCl 0,9%) à une température située entre 4 et 22°C. Ces anticorps ne peuvent pas traverser la barrière placentaire. [3]

Fig.2 Anticorps de type IgM

2.1.2.2 Immunoglobulines de type IgG

Les IgG sont généralement des alloanticorps. Ils se fixent à la membrane érythrocytaire mais ne produisent pas d'agglutination in vitro en milieu salin. Ce sont des anticorps chauds, leur température optimale pour la réaction d'agglutination in vitro est de 37°C. Contrairement aux IgM, les IgG ont besoin d'artifices techniques pour l'agglutination (réactif de Coombs, albumine, enzymes). Ils sont généralement produits par immunisation suite à un transfert d'antigènes (grossesse ou transfusion). Ces anticorps peuvent passer la barrière placentaire. [3]

Fig.3 Anticorps de type IgG

2.1.3 Le complément

Le système du complément est une cascade biochimique complexe du système immunitaire composé d'une trentaine de protéines membranaires ou circulantes dans le plasma. L'activation du complément provoque selon la voie d'activation une cytolyse, une chimiotaxie, une opsonisation ou une inflammation. [3]

Les anticorps capables d'activer le complément sont des hémolysines. Leur activation après fixation sur la membrane érythrocytaire dépend de leur quantité, de leur classe ou sous-classe et de leurs propriétés. [3]

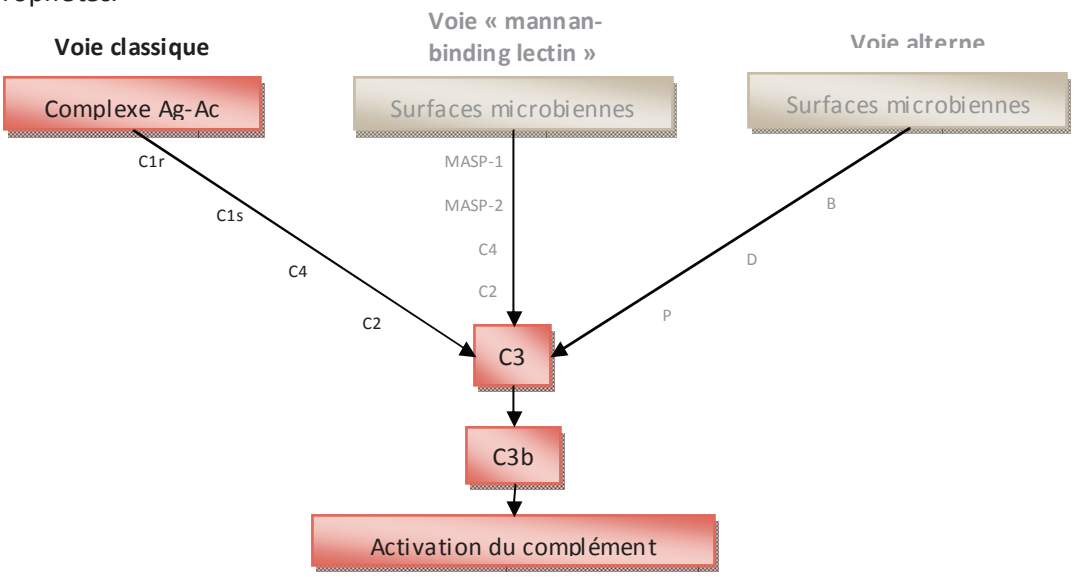

Fig.4 Voies d'activation de la cascade du complément

Les hématies recouvertes de C3b sont détruites par le foie. Lors du test de Coombs, on ne recherche pas la présence de C3b car il est instable. Mais la présence de son produit de dégradation, qui est beaucoup plus stable, le C3d. [3]

1.2 Test de Coombs direct

Le test de Coombs direct, appelé également test direct à l'antiglobuline, permet de déterminer si des hématies ont été sensibilisées in vivo par des anticorps de type IgG ou des fractions du complément (C3d). Ces anticorps sont mis en évidence par un sérum de Coombs polyspécifique qui contient en général des anti-immunoglobulines humaines et des anti-C3d humains. L'ajout du sérum de Coombs crée des ponts entre les molécules fixées sur les hématies, provoquant ainsi une agglutination. Pour que la réaction puisse être positive, il faut au minimum 200 molécules d'Ig sur un érythrocyte. Si les immunoglobulines sont en trop faible quantité le test apparaîtra négatif. [3,4]

En cas de réaction positive avec le sérum de Coombs polyspécifique, des réactifs monospécifiques sont utilisés afin de déterminer la spécificité des anticorps fixés sur les hématies (IgG, IgM, IgA, C3d).

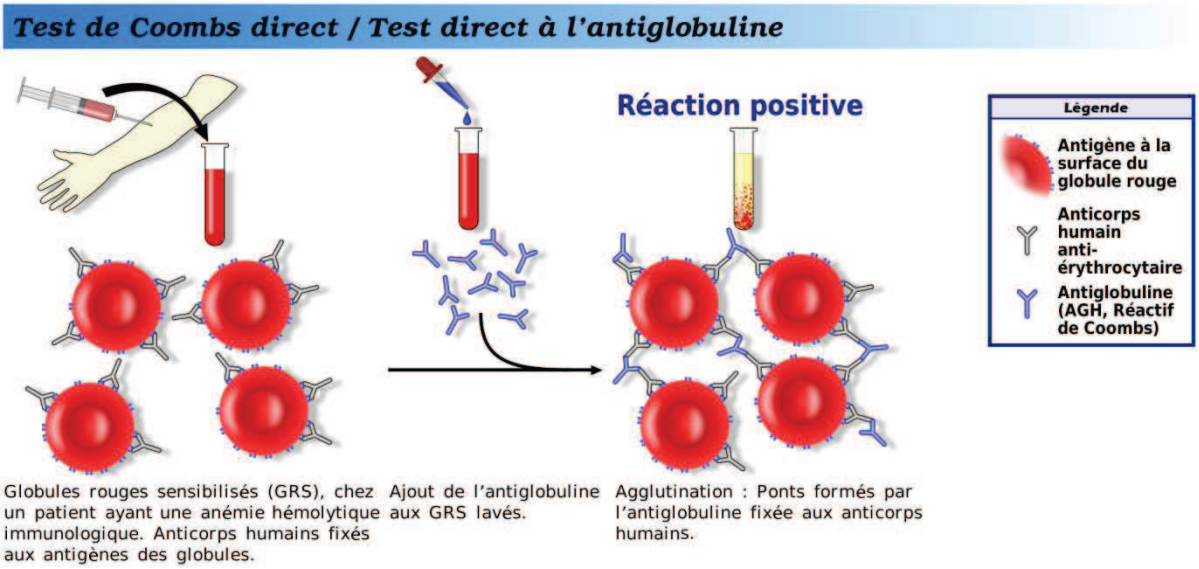
Test de Coombs direct / Test direct à l'antiglobuline
Réaction positive
Légende
Antigène à la surface du globule rouge
Anticorps humain anti-érythrocytaire
Antiglobuline (AGH, Réactif de Coombs)
Globules rouges sensibilisés (GRS), chez un patient ayant une anémie hémolytique immunologique. Anticorps humains fixés aux antigènes des globules.
Ajout de l'antiglobuline aux GRS lavés.
Agglutination : Ponts formés par l'antiglobuline fixée aux anticorps humains.

Fig.5 Test de Coombs direct ou Test direct à l'antiglobuline

Une des étapes les plus importantes du test de Coombs est celle des lavages. Cette étape permet d'éliminer le plasma en excès autour des hématies. En cas de mauvais lavages, les protéines se trouvant dans le plasma peuvent neutraliser le sérum de Coombs, le rendant indisponible pour les hématies sensibilisées. Le résultat du test est donc faussement négatif. [3,5]

Le Coombs direct est utilisé dans plusieurs cas, par exemple lors d'un bilan d'incompatibilité foeto-maternelle, suite à une anémie immuno-hémolytique ou encore comme analyse complémentaire suite à une réaction transfusionnelle. [3]

2.3 Test de Coombs indirect

Le test de Coombs indirect permet de révéler la présence d'un complexe antigène-anticorps à la surface des hématies. Tout comme pour le Coombs direct, les IgG sont recherchés. Le but de ce test est de sensibiliser les hématies avec les anticorps contenus dans un plasma ou un antisérum. Si l'antigène correspondant à l'anticorps est présent à la surface des hématies les anticorps vont se

fixer. Celles-ci étant trop éloignées pour se fixer entre elles, le réactif de Coombs va leur permettre, d'agglutiner. [3]

La procédure du test de Coombs indirect est quelque peu différente de celle du Coombs direct. En effet, afin de sensibiliser les hématies in vitro, celles-ci doivent être incubées à 37°C, température optimale pour les réactions antigène-anticorps de type IgG.

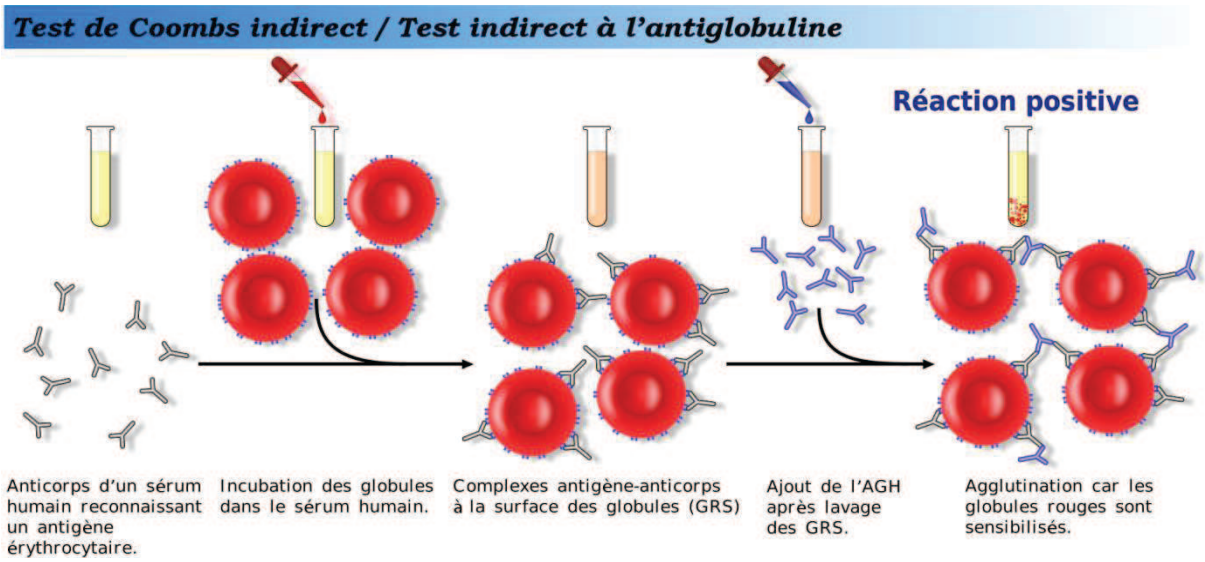
Test de Coombs indirect / Test indirect à l'antiglobuline
Réaction positive
Anticorps d'un sérum humain reconnaissant un antigène érythrocytaire.
Incubation des globules dans le sérum humain.
Complexes antigène-anticorps à la surface des globules (GRS)
Ajout de l'AGH après lavage des GRS.
Agglutination car les globules rouges sont sensibilisés.

Fig.6 Test de Coombs indirect ou Test indirect à l'antiglobuline

Tout comme pour le test de Coombs direct les lavages sont très importants. S'ils ne sont pas bien effectués, les résultats peuvent apparaître faussement négatifs.

Le test de Coombs indirect est utilisé pour les tests de compatibilité majeur (plasma du receveur, hématies du donneur), pour la recherche d'anticorps irréguliers dans le plasma du patient (plasma à tester, hématies avec antigènes connus), mais aussi pour la recherche d'un phénotype érythrocytaire (hématies à tester, antisérum contenant des anticorps connus). [3]

2.4 Réactifs utilisés pour les tests de Coombs

2.4.1 Immusol Compact®

Pour le lavage des hématies le service de transfusion sanguine CRS recommande l'utilisation d'une solution saline isotonique dont le pH est compris entre 7,0 et 7,5. A l'UMT, la solution utilisée pour les suspensions, les lavages et les dilutions est l'Immusol Compact®. [8,2]

2.4.1.1 Composition de l'Immusol Compact ®

L'Immusol Compact® est un concentré de phosphate ionique (PBS), il contient 0,4 % de sodium azide et son pH est de 7,3 ± 0,2. Il est dilué 20x avec de l'eau déminéralisée avant son emploi. [8]

2.4.1.2 Stabilité de l'Immusol Compact ®

L'Immusol Compact® se conserve entre 15 et 30°C jusqu'à la date de péremption. Une fois dilué, il doit être utilisé dans les 12 semaines. Il est important de le stocker à la température indiquée par le fabricant car à une température inférieure à 15°C de petits cristaux se forment. Ces

cristaux peuvent par la suite obstruer un tuyau du lave globules, les hématies ne seront donc pas suffisamment lavées.

2.4.2 Enlisst-II ®

L'Enlisst-II® est une solution de Liss (Low Ionic Strengh Solution = solution à faible concentration ionique) produite par le fabricant Medion. Elle est utilisée pour les tests de Coombs indirect mais n'est pas indispensable. Elle permet uniquement d'accélérer la réaction et donc réduire le temps d'incubation. Pour ce faire, cette solution agit sur le pH, la force ionique du milieu et facilite la fixation des anticorps sur les antigènes. [3,9]

Dans le plasma, les érythrocytes sont éloignés les uns des autres par le potentiel zêta. Ce potentiel correspond à la différence entre les charges électriques des deux couches de cations entourant les hématies. A cause de cette éloignement érythrocytaire, les IgG, qui sont de petites molécules ne peuvent pas se lier, il n'y a donc pas d'agglutination. Pour que l'agglutination ait lieu le potentiel zêta doit être réduit, c'est le rôle de la solution de Liss. [3]

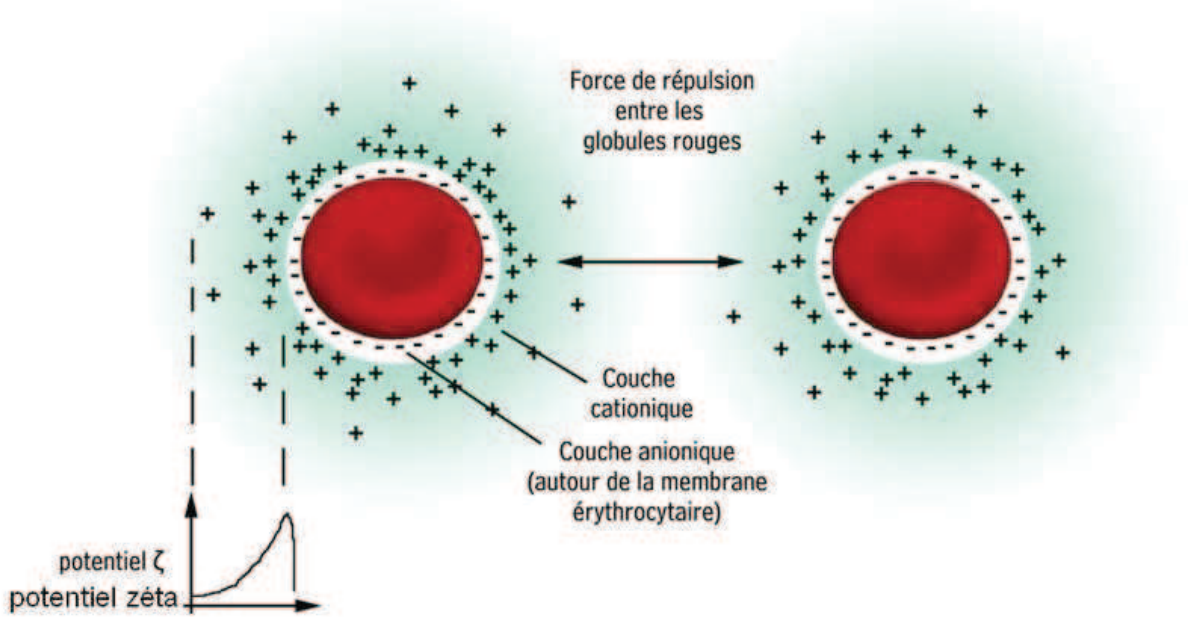

Fig.7 Potentiel zêta

2.4.2.1 Composition de l'Enlisst-II®

L'Entlisst-II® contient de l'albumine bovine, de la glycine, de la gélatine et un agent conservateur. Il est tamponné avec du phosphate. [9]

2.4.2.2 Stabilité

L'Enlisst-II® doit être conservé à température ambiante. Il ne faut pas le réfrigérer, car l'albumine bovine précipite à froid. Une fois ouvert le réactif reste stable 45 jours tant qu'il ne dépasse pas la date de péremption. [9]

2.4.3 Coombs serum IgG

L'UMT utilise deux sortes de sérum de Coombs :

- « Anti-Human Globuline Mono-type » (Medion) :
  - Contient des IgG et du C3d
  - Utilisé quand la recherche du C3d a un sens au niveau clinique (par exemple en cas d'anémie hémolytique)
- « Coombs-serum IgG » (Bio-Rad) :
  - Contient des IgG polyspécifiques mais pas de C3d

Selon le fabricant « L'importance d'un anticomplément dans un réactif polyspécifique est discutable étant donné que les anticorps qui ne peuvent être détectés que par leur aptitude à se lier au complément fixés sont rares ». [10]

Fig.8 Sérum de Coombs IgG

2.4.3.1 Composition du Coombs-serum IgG

Le Coombs sérum IgG contient des anti-IgG polyspécifiques de lapin ainsi qu'une solution de conservation. [10]

2.4.3.2 Stabilité

Le sérum est stable jusqu'à sa date de péremption s'il est conservé entre 2 et 8°C. [10]

2.4.3.3 Interprétation des résultats

Une réaction positive avec une agglutination plus ou moins forte, indique une réaction entre des anticorps et des antigènes érythrocytaires. Une réaction négative (aucune agglutination visible), indique qu'il n'y a pas de réaction anticorps-antigène. Pour valider les résultats chaque test de Coombs négatif doit être confirmé par un contrôle positif, le Coombs contrôle. [10]

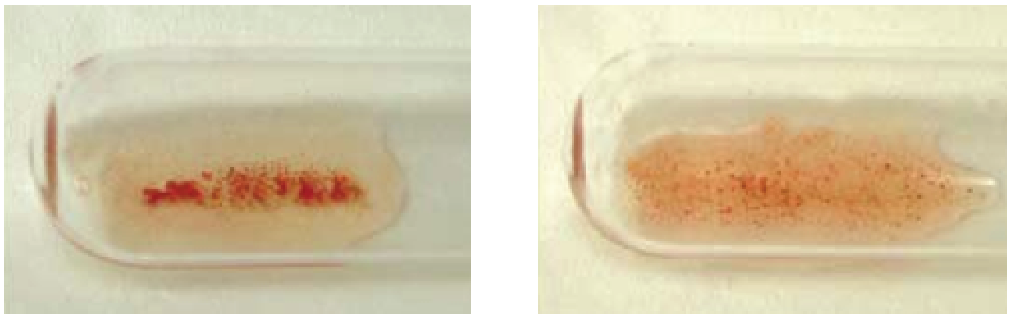

Fig.9 Coombs positif, agglutinations visibles

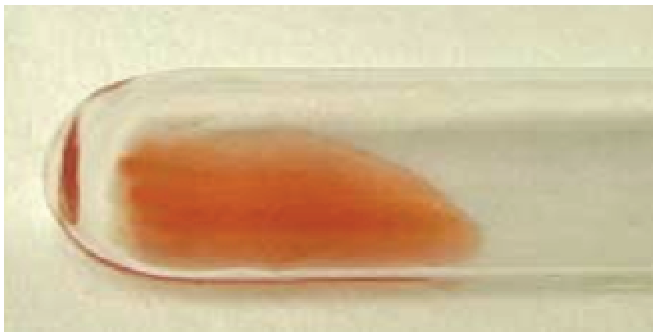

Fig.10 Coombs négatif, aucune agglutination visible

2.4.4 Coombs Contrôle

Le Coombs contrôle est une suspension d'hématies humaines sensibilisées avec des anticorps IgG humains. Le contrôle employé à l'UMT est fabriqué par Medion. Il est utilisé lorsqu'un test de Coombs est négatif. Il permet de détecter les faux négatifs, qui pourraient être dû à un oubli d'ajout de réactif ou à un lavage mal effectué. [2,11]

Si le test de Coombs est réellement négatif, les hématies du Coombs contrôle réagissent avec les anticorps du sérum de Coombs qui sont encore libres (car non fixés lors du test de Coombs) et forment une agglutination. Cependant, bien qu'il n'y ait aucune agglutination visible, il se peut que le test de Coombs soit légèrement positif mais que les agglutinations ne soient pas visible macroscopiquement. [3,11]

Si après l'adjonction du Coombs contrôle il n'y a aucune réaction, il faut recommencer le test en suivant méticuleusement toutes les étapes afin d'obtenir un résultat positif. Ce problème peut être dû à des lavages insuffisants, à une contamination de la solution saline isotonique ou à un sérum de Coombs inactif voire contaminé. [11]

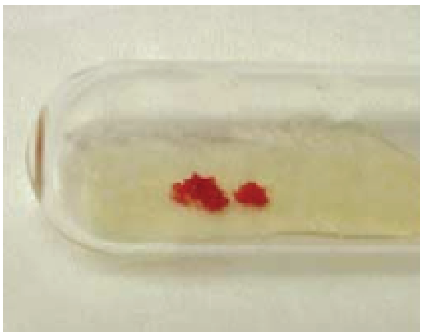

Fig.11 Coombs contrôle positif

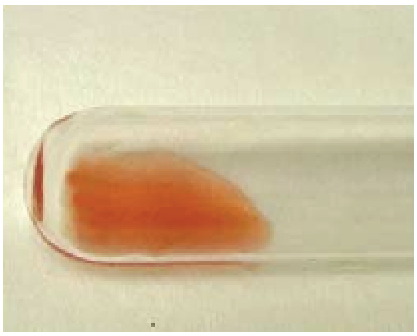

Fig.12 Coombs contrôle négatif

2.4.4.1 Composition du Coombs Contrôle

Le Coombs contrôle est constitué d'une suspension d'hématies humaines de groupe O Rhésus positif à une concentration de 5%, sensibilisées avec des anticorps IgG humains (anti-D incomplet) en solution isotonique tamponnée contentant des agents conservateurs. [4,11]

2.4.4.2 Stabilité

S'il est conservé entre 2-8°C, le Coombs contrôle est stable jusqu'à la date de péremption. Cependant la réactivité du produit peut diminuer légèrement au fil du temps. Certains signes montre une détérioration du produit, par exemple une hémolyse, un assombrissement des cellules ou encore l'apparition spontanée d'amas. [11]

Laves globules

3.1 Généralités

Comme mentionné précédemment, les lavages sont une étape très importante lors des tests de Coombs. S'ils sont mal effectués, le résultat du test peut être faussé. L'UMT possède deux laves globules de marques différentes :

- De la marque Medion — Utilisé au laboratoire des urgences
- De la marque DiMed (firme ratachée à Bio-Rad) — Utilisé au laboratoire de routine

Ces laves globules nous permettent un lavage rapide et standardisé des tubes. Le principe général d'un lave globules est le suivant : un tube contenant une goutte d'érythrocytes est introduit dans le lave globules. Une fois le programme de lavage lancé, le tube est rempli avec de l'Immusol, centrifugé puis décanté. Et ceci pour les 3 cycles. A la fin le tube ne contient plus que des hématies lavées.

3.2 Lave-globules DiaMed

Le lave globules DiaMed est un DiaCent-CW. Installé à l'UMT en 2003, il est utilisé dans le laboratoire de routine où quelques cas de Coombs contrôle négatifs sont recensés par mois.

3.2.1 Description[12,13]

- Laveuse-centrifugeuse de cellules automatique
- 24 tubes disposés dans 4 porte-tubes
- Suspensions cellulaires ajustées
- Vitesse maximum de 2500 rotation par minute (rpm)
- Temps et vitesse de centrifugation ajustables
- Dimension : 31 cm / 27 cm / 40 cm
- Poids : 9.2 Kg

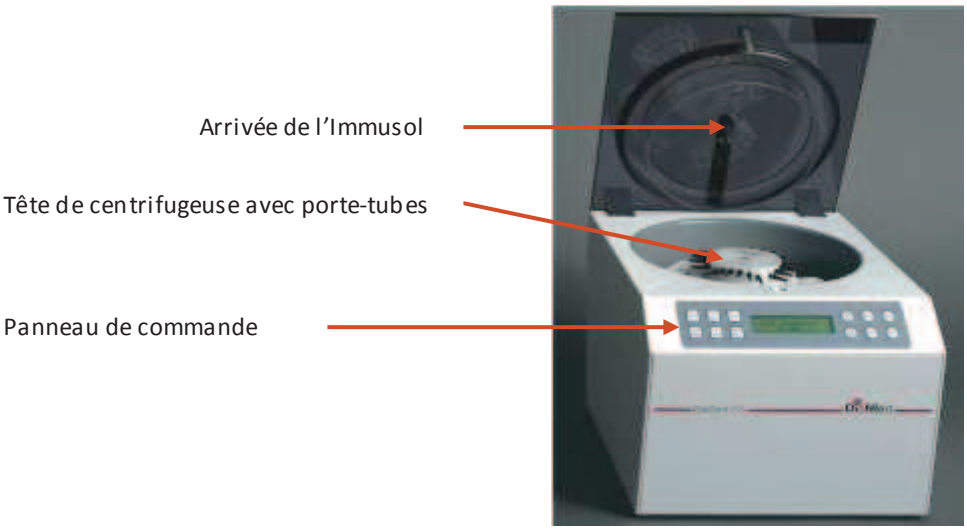

Fig.13 Lave globule DiaMed

3.2.2 Fonctionnement

Selon l'étape du programme, le sens de rotation n'est pas le même. Lors de la centrifugation, du lavage et de la mise en suspension, la rotation se fait dans le sens des aiguilles d'une montre. Lors de la décantation, la rotation se fait dans le sens contraire. [13]

La force centrifuge permet à l'Immusol® qui arrive dans la tête de centrifugeuse de se répartir uniformément dans les tubes. La rotation dans le sens des aiguilles d'une montre permet le basculement des portes-tubes vers l'extérieur. Dans l'étape de décantation, la rotation se fait dans le sens contraire, ainsi les port-tubes sont bloqués dans une position quasi verticale et la force centrifuge les vide jusqu'à une volume prédéfini. [13]

Le programme utilisé sur ce lave globules est le programme de référence donné dans le mode d'emploi du fournisseur DiaMed. Cependant il est possible de définir ses propres programmes si on le désire, par exemple si la sensibilité du procédé n'est pas suffisante.

Un lavage est constitué de 3 cycles identiques. Pour un cycle, le programme est le suivant : [13]

- Lavage pendant 25 secondes à 2100 rpm :
    - Injection d'Immusol pendant 3,8 secondes
    - Pause de 4 secondes
    - Injection d'Immusol pendant 3,5 secondes
- Décantation pendant 8 secondes à 500 rpm

Pour les 3 lavages habituellement réalisés pour les tests de Coombs cette centrifugeuse prend environ 3 minutes.

Il faut préciser que le rotor du lave globules DiaMed n'est pas rond contrairement à celui de chez Medion. Lors de la centrifugation, les tubes ne sont donc pas tous traités exactement de la même manière. Lorsque les portes-tubes basculent vers l'extérieur, les tubes ne se retrouvent pas tous au même niveau. Cependant, lors de la réalisation de la partie pratique, il n'a pas pu être démontré que la différence entre les forces d'agglutination était due essentiellement à cette petite différence.

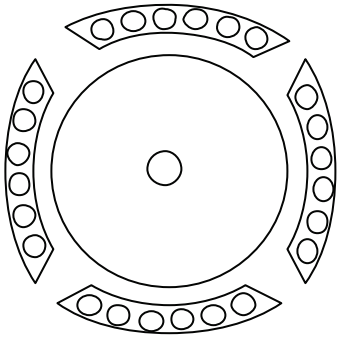

Fig.14 Rotor Bio-Rad vu depuis dessus

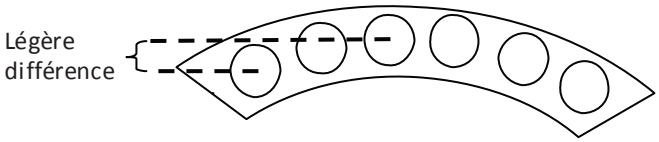

Fig.15 Porte-tubes lorsqu'il se trouve à l'horizontal

3.3 Lave globules Medion

Le lave globules Medion est un DAC III. Installé à l'UMT en 2010, il est utilisé dans le laboratoire des urgences où plusieurs cas de Coombs contrôle négatif sont recensés par mois. [14,15]

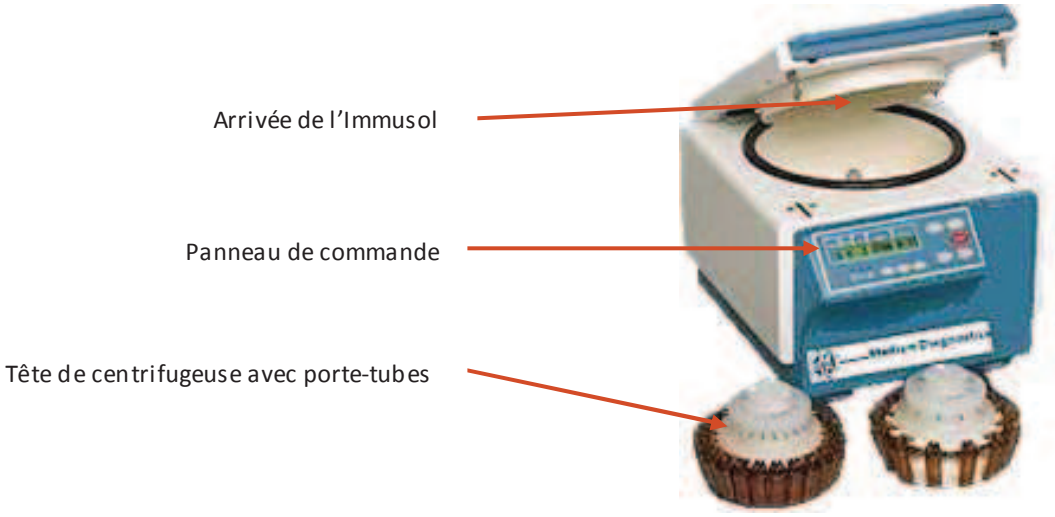

Fig.16 Lave globules Medion

3.3.1 Description [14]

- Laveuse-centrifugeuse de cellules automatique
- 24 tubes
- Temps et vitesse de centrifugation ajustables
- Vitesse maximum 3500rpm
- Dimensions : 28 cm / 33 cm / 39.5 cm
- Poids : 23 kg

3.3.2 Fonctionnement

Tout comme pour le lave globules DiaMed, la rotation se fait dans un sens lors des lavages, de la centrifugation ou de la suspension et dans l'autre sens pour la décantation (principe des tubes bloqués à la verticale). Cependant le rotor est rond et chaque tube peut bouger individuellement, ils sont donc tous traités de la même manière. [14]

Suite à de nombreux problèmes, le programme enregistré sur ce lave globules a du être modifié à plusieurs reprises.

Un lavage est constitué de 3 cycles identiques. Pour un cycle le programme est le suivant :

- Remplissage des tubes avec 3 ml d'Immusol
- Centrifugation 2500 rpm pendant 45 secondes
- Décantation 400 rpm

Pour les 3 lavages habituellement réalisé pour les tests de Coombs cette centrifugeuse prend environ 5 minutes.

Lors de problèmes avec un lave globules, il est possible de modifier les paramètres afin d'obtenir des résultats plus satisfaisants. Les deux principaux paramètres sur lesquels il est possible de jouer sont la vitesse de centrifugation et la vitesse de décantation. Si on décide d'augmenter la vitesse de centrifugation, il restera une plus grande quantité d'érythrocytes au fond du tube. Si on augmente la vitesse de décantation, les tubes seront plus décantés.

3.4 Rencontre avec les représentantes Bio-rad et Medion

Le 12 et 13 janvier 2012, Mesdames Anna Galvani (représentante Bio-rad) et Marika Villeumier (représentante Medion) sont venues à l'UMT afin de présenter leur lave globules et répondre à quelques questions. Il en ressort de ces entretiens que le laboratoire UMT est l'un des seuls laboratoires à être confronté à des problèmes récurrents de Coombs contrôle négatifs. Selon Mme Galvani, l'UMT étant un grand laboratoire, les laves globules tournent trop souvent par rapport à une utilisation habituelle. Il serait peut être judicieux de procéder à des maintenances quotidiennes et du fournisseur plus fréquentes. Pour elle « la quantité d'érythrocytes au départ a une grande importance, une grosse goutte d'érythrocytes est amplement suffisante voire déjà superflue ».

3.5 Laves globules DiaMed et Medion

3.5.1 Différences

Les programmes utilisés sur les deux laves globules sont très différents. L'automate Medion met 2 minutes de plus que le DiaMed pour réaliser les 3 lavages. Il a aussi été constaté que le modèle Medion terminait son cycle de lavages avec moins d'érythrocytes que celui de DiaMed. De plus, grâce

à un paramètre de l'appareil Medion (le DSpinDown), les tubes sortent plus " propre " que du lave globules DiaMed. Ce paramètre consiste en une centrifugation permettant aux hématies se trouvant sur la paroi du tube de se glisser au fond de celui-ci.

Autre différence importante, le lave globules DiaMed permet de modifier les paramètres pour chaque programme. Pour le lave globules Medion, la programmation se fait en deux temps : les paramètres globaux et les paramètres de programme. Une fois les paramètres globaux introduits, ils resteront les mêmes pour tous les programmes introduits par la suite. Les paramètres de programme peuvent eux être introduits différemment pour chaque nouveau programme.

En répertoriant les problèmes de Coombs contrôle négatif sur un mois, l'UMT a constaté qu'il y avait plus de problèmes sur l'automate du laboratoire des urgences que sur celui de la routine (Annexe 3). Cependant, il ne faut pas oublier que ce laboratoire est ouvert 24h/24, il est donc normal que le nombre de Coombs contrôle négatifs soit plus élevé.

3.5.2 Avantages et inconvénients des deux laves globules

	Avantages	Inconvénients
Medion	• La majeure partie des réactifs utilisés pour les tests sont fabriqués par Medion (Coombs contrôle, Enlisst-II, Immusol). • Les tubes sont "propres" lorsqu'ils sont sortis de la machine.	• Le temps de lavage est plus long. • Le programme donné par le fabricant doit être modifié pour un bon fonctionnement. • Les tubes sont plus difficiles à mettre et à sortir. • Le lave globule est deux fois plus lourd que le DiaMed. • Pas de visibilité à l'intérieur du lave globules une fois le couvercle fermé.
DiaMed	• Le temps de lavage est plus rapide. • Le programme donné par le fabricant fonctionne correctement, sans avoir besoin de le modifier. • Les tubes peuvent être mis et enlevés facilement. • Le lave globules est léger. • Le couverde est transparent, on peut donc voir ce qu'il se passe dans le lave globules.	• Les tubes sont sales lorsqu'ils sont sortis de la machine. • Le rotor n'est pas rond.

Tableau 1. Avantages et inconvénients des deux laves globules

Partie pratique

4.1 Objectifs

Les objectifs pour la partie pratiques sont les suivant :

- Déterminer si la quantité d'érythrocytes au départ à une influence sur le résultat du Coombs contrôle.
- Standardiser la concentration de la suspension érythrocytaire.
- Déterminer s'il y a une différence entre le premier lavage fait à la main et celui fait par l'automate pour le Coombs Indirect.
- Raccourcir le temps de lavage du lave globules Medion.
- Déterminer quel programme est le plus efficace pour le lave globules Medion.

4.2 Matériel et Méthodes

4.2.1 Matériel

1.2.1.1 Sang EDTA

Chaque jour l'UMT reçoit des prélèvements de donneurs afin de réaliser des analyses immunohématologiques. Ces échantillons sont conservés 24 heures à 4°C, puis sont éliminés.

Comme tous les tubes reçus à l'UMT, les tubes donneurs sont prélevés sur EDTA. Ces tubes donneurs ont plusieurs avantages. Premièrement, la probabilité d'avoir des tests de Coombs positifs est faible. En effet, les donneurs sont théoriquement sains et un dépistage d'anticorps est effectué lors du premier don ou suite à une grossesse. Deuxièmement, ils permettent de ne pas utiliser les tubes patients qui doivent être conservés en cas de tests complémentaires à effectuer. Finalement, ils contiennent un volume important de sang pour réaliser plusieurs tests de Coombs avec différents paramètres. Pour ce travail 50 donneurs ont été testés en parallèle sur les deux laves globules (liste des tubes Annexe 4).

4.2.1.1 Sérum de Coombs utilisé pour la partie pratique

Pour la partie pratique, les réactifs fournis par Bio-Rad ont été utilisés. Ceux si contiennent des IgG et du C3d.

4.2.2 Méthodes

Les objectifs ne sont pas tout à fait identiques pour les deux laves globules (voir chapitre 4.1). Afin de raccourcir le temps de lavages de l'automate Medion, plusieurs programmes ont été testés parallèlement. Pour cela, deux programmes différents ont été définis :

Programme 1 : programme Medion actuellement utilisé

Programme 2 : programme proche de celui de DiaMed

La signification de chaque paramètre présent dans le tableau 2 se trouve dans l'Annexe 7.

		Programme 1	Programme 2
Paramètres globaux	Volume Adjust	0	0
	Rotor (places)	24	24
	Shakings	30	0
	Suspension Agitation	30	10
	Dspin Down	10	0
	Suspension M.	NO	NO
	Agit Spin M.	YES	YES
	Spin Decant M.	NO	NO
Paramètres du programme	Cycle	3	3
	SalWash (ml)	3	3
	Wash (rpm)	2500	2100
	Twash (sec)	0.45	0.25
	Decant (rpm)	400	500
	Dspin Down	ON	-
	Agit Spin	ON	ON
	Spin	2500	2500
	Tspin (20sec)	20	20

Tableau 2. Paramètres des programmes Medion 1 et 2

Les paramètres du programme 2 de Medion ont été modifiés afin qu'ils soient le plus proches possible du programme de DiaMed. Cependant, le mode de paramétrage des deux appareils étant différent, il n'a pas été possible de les rendre parfaitement identiques.

Les schémas qui suivent représentent les tests effectués sur chaque lave globules.

Pour le lave globule DiaMed :

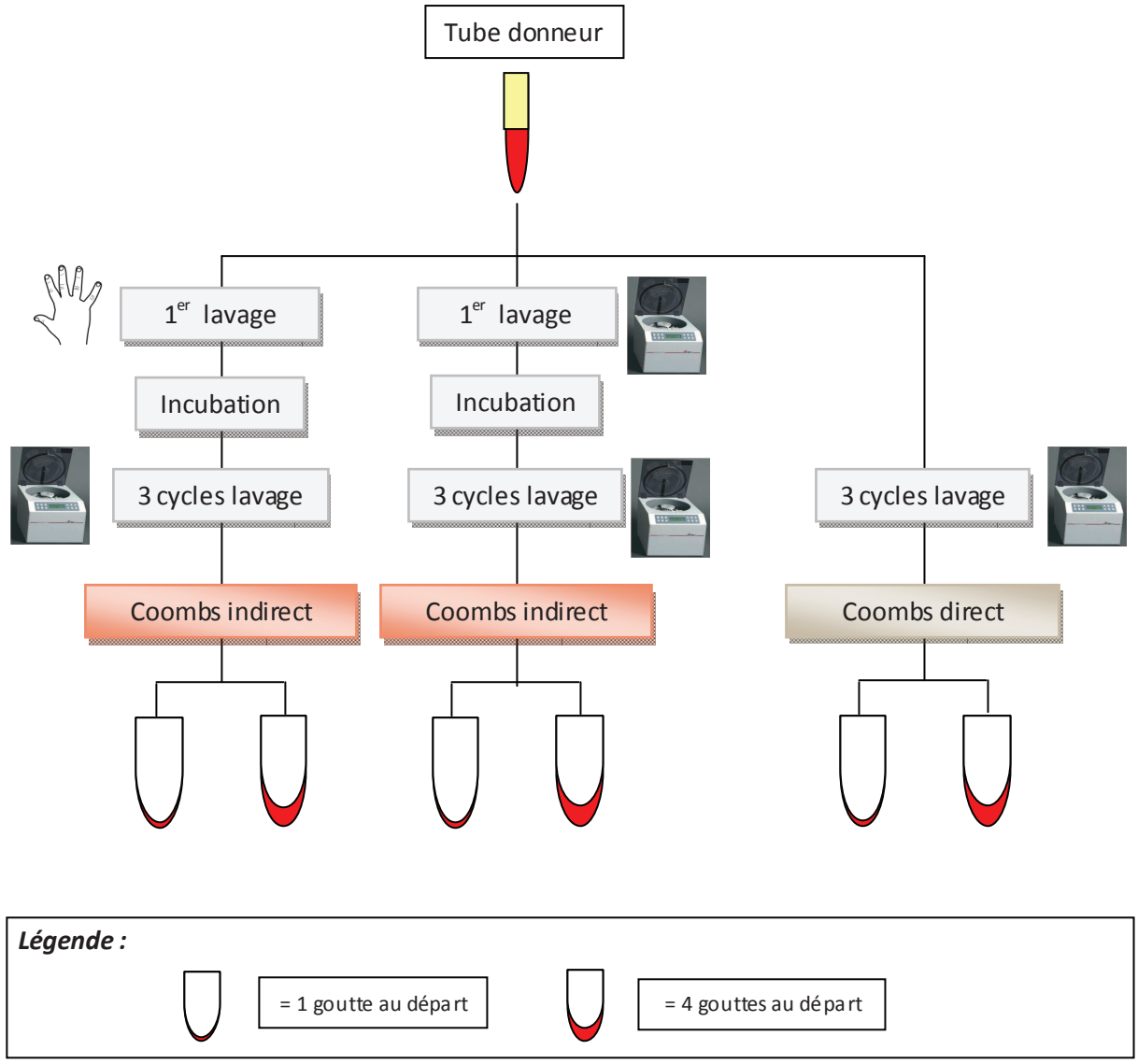

Fig.17 Schéma de la partie pratique sur lave globules DiaMed

Pour le lave globule Medion :

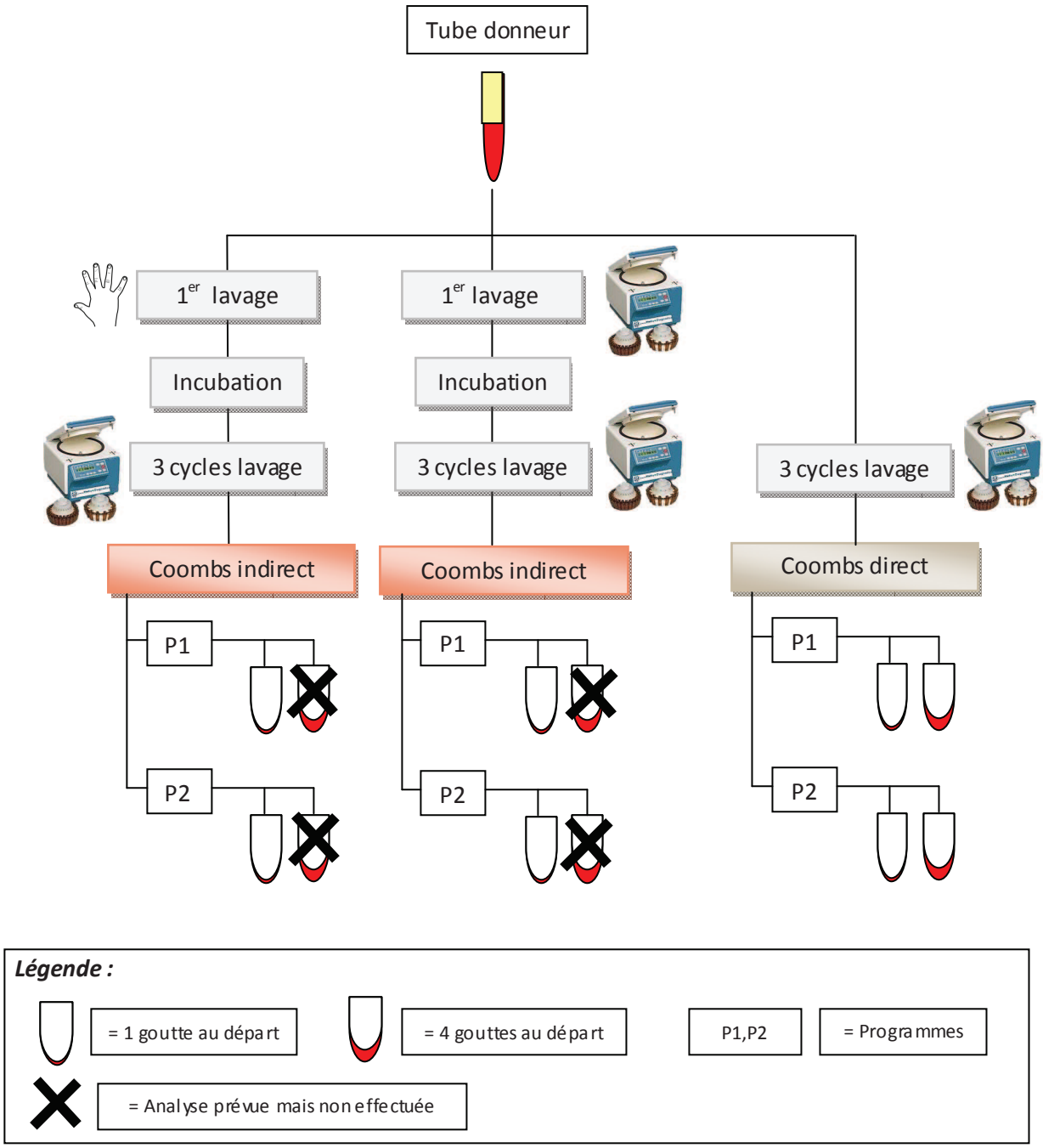

Fig.18 Schéma de la partie pratique sur lave globules Medion

Les analyses biffées étaient prévues mais n'ont pas pu être effectuées. En effet, pour les cas de Coombs contrôles négatifs nécessitant la répétition du test, la quantité de globules rouges était insuffisante pour réaliser toutes les analyses. Le protocole officiel des tests de Coombs indiquant que les tests doivent être effectués avec une goutte d'érythrocytes, les analyses effectuées avec 4 gouttes ont été abandonnées.

4.3 Protocoles

Pour réaliser les tests de Coombs, les protocoles établis et validés par le laboratoire UMT ont été utilisés. Afin rendre la méthode plus régulière, une solution framboise étalon à 3% a servi d'exemple pour toutes les autres suspensions. Le protocole initial mentionne de mettre une goutte d'érythrocytes par tube. Dans le cadre de ce travail de diplôme, il a été décidé de tester le protocole avec 1 ou 4 gouttes au départ afin de déterminer l'influence d'une trop grande quantité d'hématies.

Il est important de préciser que les têtes de centrifugations des deux laves globules ont été rincées à l'eau chaude avant le début de la partie pratique. Ceci est rarement fait dans le quotidien du laboratoire, mais a permis d'enlever d'éventuels petits cristaux d'Immusol qui auraient pu se former dans les tuyaux de distribution et compromettre les résultats.

4.3.1 Coombs direct

- Mettre 1 ou 4 gouttes d'érythrocytes dans un tube
- Laver 3 fois les hématies à tester
- Préparer une suspension d'hématies à 3% dans de l'Immusol
- Distribuer 1 goutte de sérum de Coombs + 1 goutte de la suspension érythrocytaire
- Centrifuger
- Lire macroscopiquement
- Ajouter le Coombs contrôle en cas de Coombs direct négatif
- Centrifuger
- Lire macroscopiquement [6]

4.3.2 Coombs indirect

Comme indiqué dans le chapitre « 2.3 Coombs Indirect » le test de Coombs indirect est utilisé de différentes manières. A l'UMT, la majeure partie des problèmes rencontrés avec le Coombs contrôle touchent les tests de compatibilité. C'est pourquoi les tests de Coombs indirect ont été effectués uniquement pour les tests de compatibilité.

Pour un test de compatibilité, on fait réagir le plasma du patient avec les érythrocytes du donneur. Dans le contexte de ce travail, il serait possible d'utiliser du NaCl à la place du sérum car le but est d'obtenir une réaction négative. Cependant, il est plus intéressant de travailler avec du plasma pour se trouver dans des conditions réelles. Il a donc été choisi pour des raisons de facilité de travailler avec le plasma et les érythrocytes du donneur, ainsi les conditions sont réelles et le test est forcément négatif.

- Mettre 1 ou 4 gouttes d'érythrocytes dans un tube
- Laver 1 fois les érythrocytes soit à la main soit avec le lave globules
- Préparer une suspension 3% d'hématies dans de l'Immusol
- Distribuer 2 gouttes de plasma + 1 goutte de suspension érythrocytaire + 2 gouttes de Liss
- Incuber 15 minutes à 37°C
- Laver 3 fois
- Ajouter 2 gouttes de sérum de Coombs
- Centrifuger
- Lire macroscopiquement puis au microscope
- Ajouter le Coombs contrôle en cas de Coombs direct négatif

- Centrifuger
- Lire macroscopiquement [7]

4.3.3 Que faire en cas de Coombs contrôle négatif ?

Lors de Coombs contrôle négatifs la procédure suivante a été suivie, les deux premiers points ont été effectués pour touts les cas, les suivants on été effectués si les deux premiers cas sortaient toujours négatifs :

1) Ajouter une goutte de Coombs contrôle
2) Refaire le test à partir de la même solution framboise avec les mêmes réactifs
3) Refaire le test à partir de la même solution framboise avec d'autres réactifs
4) Refaire le test depuis le début en lavant le tube à une autre position
5) Refaire le test avec la nouvelle solution framboise et les mêmes réactifs
6) Refaire le test avec la nouvelle solution framboise et d'autres réactifs

4.4 Réactifs utilisés

4.4.1 DiaClon Coombs – Serum Anti-IgG, Anti-C3d

Bouteille N°	N° lot	Date d'expiration
1	14070.23.10	08.2012
2	14070.24.20	11.2012
3	14070.24.21	11.2012
4	14070.25.20	09.2013
5	14070.25.20	09.2013

Tableau 3. Lots de sérum de Coombs

4.4.2 Coombs Control Girofls

Bouteille N°	N° lot	Date d'expiration
1	635012001	03.03.2012
2	635012001	03.03.2012
3	635012001	03.03.2012
4	635012001	03.03.2012
5	635012002	31.03.2012

Tableau 4. Lot de Coombs contrôle

N° lot	Date d'expiration
344.018.1A	11.11.2012

4.4.3 Entliss-II®

Tableau 5. Entliss-II®

4.4.4 Immusol®

N° lot	Date d'expiration
66011101	12.09.2013

Tableau 6. Immusol®

4.5 Résultats des tests effectués

4.5.1 Forces d'agglutination

La force d'agglutination permet de quantifier la force de la réaction. Normalement, plus les hématies sont sensibilisées plus la réaction devrait être forte (sauf pour les cas d'effet de zone). A l'UMT, la force d'agglutination du Coombs contrôle n'est habituellement pas prise en compte. En effet, le but est simplement d'observer une agglutination pour valider les tests de Coombs. Toutefois, ce travail de diplôme jouant sur plusieurs comparaisons de méthodes et d'appareils, il est important de quantifier ces agglutinations afin de pouvoir comparer les différents résultats obtenus.

Cinq forces d'agglutination sont prises en compte :

Agglutination	Croix	Aspect visuel
Très forte	++++	Toutes les hématies sont agglutinées, le surnageant est clair.
Forte à moyenne	+++	Les hématies sont agglutinées en plusieurs amas de taille moyenne, le surnageant est clair.
Légère	++	Une partie des hématies sont agglutinées en petits amas, les autres se trouvent dans le surnageant, ce qui le rend très légèrement rouge.
Faible	+	Une partie des hématies sont agglutinées en très petits amas, les autres se trouvent dans le surnageant, ce qui le rend très légèrement rouge
Très faible	(+)	Une partie des hématies sont agglutinées en très petits amas, à peine visible à l'œil nu, les autres se trouvent dans le surnageant, ce qui le rend rouge

Tableau 7. Forces d'agglutination

Lors de la partie pratique, la différenciation a été faite entre une agglutination faible et une agglutination très faible (+). Cela donne ainsi une indication supplémentaire pour les résultats, qui pourra peut être aider à la compréhension des cas de Coombs contrôles négatifs.

Il ne faut pas oublier que ces agglutinations sont lues à l'œil nu. Chaque TAB aura donc sa propre perception de la force d'agglutination. Il se peut que d'une personne à l'autre les résultats soit légèrement différents. Dans le cas de ce travail de diplôme une seule personne à effectué les tests et lu les résultats, il est donc possible de comparer les résultats des tests.

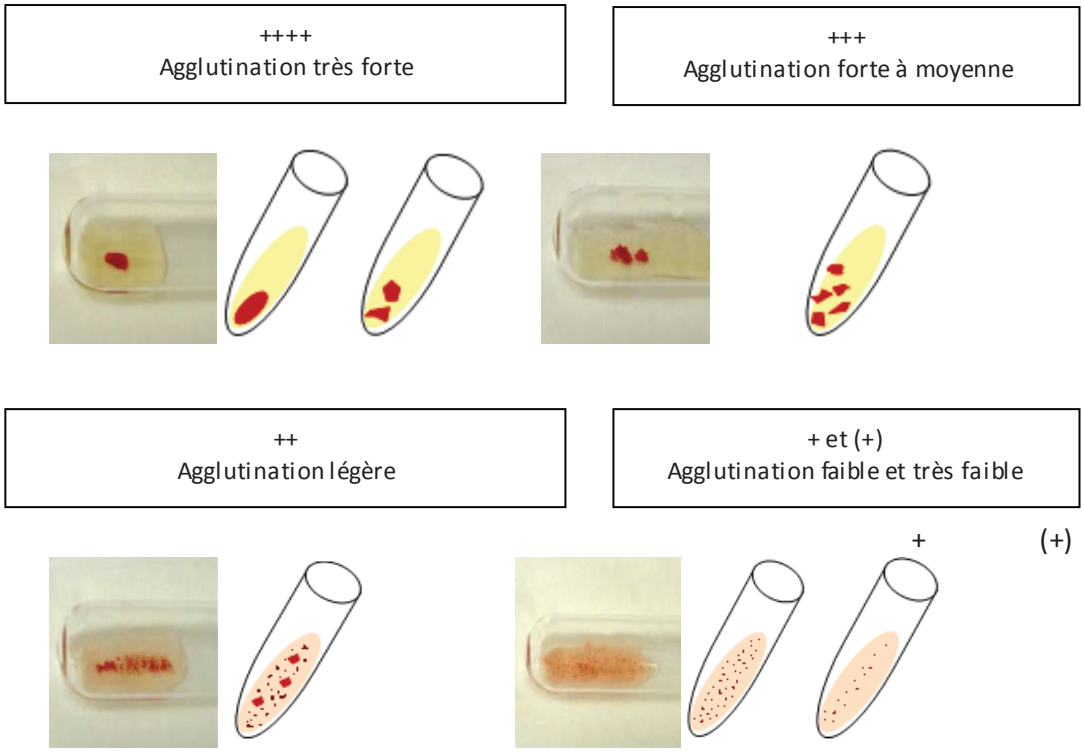

Fig.19 Forces d'agglutinations

4.5.2 Résultats de Coombs contrôles négatifs

En tout, 2.7% des tests ont révélés un Coombs contrôles négatifs, soit 19 cas sur les 700 tests effectués avec différents paramètres. 2.1 % de ces cas sont sortis négatifs lors des tests effectués avec 4 gouttes d'hématies et seulement 0.6% des cas sont sortis négatifs lorsqu'une seule goutte se trouvait dans le tube de départ. Il est donc difficile de faire des statistiques sur si peu de résultats négatifs et de déduire la cause liée au problème des Coombs contrôles négatifs.

Ces cas sont répertoriés dans le tableau 8 de la page suivante. Il détaille quelles mesures ont été prises suite à la découverte d'un Coombs contrôle négatif.

Il a vite été constaté qu'aucun des tests effectués n'a pu être confirmé négatif. Pour 18 des cas, seuls les deux premiers points de la procédure en cas de contrôle négatif (voir chapitre 4.3.3 : ajout d'une goutte de Coombs contrôle et refait le test à partir de la même solution framboise) ont été réalisés, donnant de suite une agglutination visible à l'œil nu. Un seul cas (cas 11 sur DiaMed) a nécessité la reprise du test depuis le départ.

En observant les résultats du tableau, il est claire que le problème de Coombs contrôle négatif ne provient pas des lavages. En effet, en reprenant exactement les mêmes conditions, soit la même solution framboise et les mêmes réactifs, les résultats passent d'un résultat négatif à une agglutination faible, légère, voire dans certains cas forte. On peut donc se demander quels paramètres entrent réellement en compte lors des Coombs contrôles négatifs et s'il est réellement possible de réduire voire éliminer le problème.

Légende : DiaMed | Medion programme 1 | Medion programme 2

	Cas	Tests complémentaires	Résultats	N°de bouteille	
				Coombs serum	Coombs contrôle
1	Coombs direct 4 gouttes DiaMed	- Ajout d'une goutte de Coombs contrôle (total 2 gouttes de CC) - Refait le test avec la même solution framboise	(+) +	1	1
5	Coombs direct 4 gouttes Medion programme 2	- Ajout d'une goutte de Coombs contrôle (total 2 gouttes de CC) - Refait le test avec la même solution framboise	(+) +	1	1
6	Coombs direct 4 gouttes Medion programme 2	- Ajout d'une goutte de Coombs contrôle (total 2 gouttes de CC) - Refait le test avec la même solution framboise	(+) +	1	1
7	Coombs direct 4 gouttes Medion programme 2	- Ajout d'une goutte de Coombs contrôle (total 2 gouttes de CC) - Refait le test avec la même solution framboise	(+) (+)	1	1
8	Coombs direct 4 gouttes Medion programme 2	- Ajout d'une goutte de Coombs contrôle (total 2 gouttes de CC) - Refait le test avec la même solution framboise	(+) (+)	1	1
10	Coombs direct 4 gouttes Medion programme 2	- Ajout d'une goutte de Coombs contrôle (total 2 gouttes de CC) - Refait le test avec la même solution framboise	(+) (+)	1	1
11	Coombs direct 4 gouttes Diamed	- Ajout d'une goutte de Coombs contrôle (total 2 gouttes de CC) - Refait le test avec la même solution framboise Le tube se trouvant à la même position que le tube n°1 qui a eu un problème : - Refait le test depuis le début en lavant à une autre position	Nég Nég +	1	1
11	Coombs direct 4 gouttes Medion programme 2	- Ajout d'une goutte de Coombs contrôle (total 2 gouttes de CC) - Refait le test avec la même solution framboise	(+) (+)	1	1
12	Coombs indirect 1 goutte 1er lavage automate Medion programme 1	- Ajout d'une goutte de Coombs contrôle (total 2 gouttes de CC) - Refait le test avec la même solution framboise	Nég ++	1	1
16	Coombs indirect 1 goutte 1er lavage à la main Medion programme 1	- Ajout d'une goutte de Coombs contrôle (total 2 gouttes de CC) - Refait le test avec la même solution framboise	Nég ++	2	1
17	Coombs direct 4 gouttes Medion programme 2	- Ajout d'une goutte de Coombs contrôle (total 2 gouttes de CC) - Refait le test avec la même solution framboise	(+) (+)	1	1
18	Coombs direct 4 gouttes Medion programme 2	- Ajout d'une goutte de Coombs contrôle (total 2 gouttes de CC) - Refait le test avec la même solution framboise	(+) (+)	1	1
23	Coombs direct 1 goutte Medion programme 1	- Ajout d'une goutte de Coombs contrôle (total 2 gouttes de CC) - Refait le test avec la même solution framboise	(+) (+)	4	3
24	Coombs direct 1 goutte Medion programme 1	- Ajout d'une goutte de Coombs contrôle (total 2 gouttes de CC) - Refait le test avec la même solution framboise	(+) +	4	3
28	Coombs direct 1 goutte Medion programme 2	- Ajout d'une goutte de Coombs contrôle (total 2 gouttes de CC) - Refait le test avec la même solution framboise	Nég +++	4	3
29	Coombs direct 4 gouttes Medion programme 1	- Ajout d'une goutte de Coombs contrôle (total 2 gouttes de CC) - Refait le test avec la même solution framboise	(+) +	4	3
31	Coombs direct 4 gouttes Diamed	- Ajout d'une goutte de Coombs contrôle (total 2 gouttes de CC) - Refait le test avec la même solution framboise	(+) (+)	4	3
31	Coombs direct 1 goutte Medion programme 1	- Ajout d'une goutte de Coombs contrôle (total 2 gouttes de CC) - Refait le test avec la même solution framboise	(+) ++	4	3
35	Coombs direct 4 gouttes Medion programme 1	- Ajout d'une goutte de Coombs contrôle (total 2 gouttes de CC) - Refait le test avec la même solution framboise	(+) (+)	4	3

Tableau 8. Détail des cas de Coombs contrôles négatifs

Le tableau suivant est un récapitulatif simplifié du tableau 8, il permet de voir plus clairement dans quels cas les Coombs contrôles sont sortis négatifs.

	Laveuse	Nombre de Coombs contrôles négatifs	Avec 1 goutte	Avec 4 gouttes
Coombs direct	DiaMed	3	-	3 cas sur 3
	Medion P1	5	1 cas sur 5	4 cas sur 5
	Medion P2	9	1 cas sur 9	8 cas sur 9
Coombs Indirect 1er lavage manuel	DiaMed	-	-	-
	Medion P1	1	1 cas sur 1	-
	Medion P2	-	-	-
Coombs indirect 1er lavage automate	DiaMed	-	-	-
	Medion P1	-	-	-
	Medion P2	1	1 cas sur 1	-

Tableau 9. Récapitulatif des cas de Coombs contrôles négatifs

On constate qu'une grande partie des cas (15 cas sur 19), sont apparus lors des tests effectués avec 4 gouttes d'hématies dans le tube de départ. Il n'y a eu aucun problème avec le lave globules DiaMed lorsque le protocole indiquant de déposer 1 goutte de sang dans le tube de départ est respecté. Les deux programmes Medion ont chacun eu un cas négatif lors d'un test de Coombs direct négatif.

Seuls deux cas ont été répertoriés en Coombs indirect alors que dans la vie quotidienne du laboratoire, il est plus fréquent d'obtenir un contrôle négatif lors d'un Coombs indirect que lors d'un Coombs direct (Annexe 3).

Si on ne prend en compte que les contrôles négatifs (tableau 10), on constate que la moitié des cas ont été observés avec le programme 2 de Medion et que trois quarts des cas sont dus à une quantité excessive de matériel dans le tube de départ.

Paramètre	Total de cas négatifs	Cas de Coombs contrôles négatifs	%
DiaMed	19	3	15.8%
Medion Programme 1		6	31.%
Medion Programme 2		10	52.6%
1 goutte	19	4	21.1%
4 gouttes		15	78.9%

Tableau 10. Pourcentage de Coombs contrôles négatifs selon le lave globule et la quantité de matériel au départ

Le tableau suivant donne un pourcentage des Coombs contrôles négatifs par rapport au total des tests effectués pour un paramètre. Comme pour le tableau précédent, on observe clairement un plus grand nombre de contrôle négatif lors de Coombs direct, avec le programme 2 de Medion et avec les 4 gouttes d'hématies dans le tube départ. Toutefois, on remarque que par rapport au total des tests effectués, peu de résultats sont négatifs.

	Test de Coombs	Total des tests	Cas de Coombs contrôles négatifs	%
Test de Coombs	Direct	300	17	5.6%
	Indirect lavage main	200	1	0.5%
	Indirect lavage automate	200	1	0.5%
Lave globules	DiaMed	300	3	1.0%
	Medion Programme 1	200	6	3.0%
	Medion Programme 2	200	10	5.0%
Gouttes	1 goutte	450	4	0.9%
	4 gouttes	250	10	4.0%

Tableau 11. Pourcentage de Coombs contrôles négatifs selon le nombre total de test effectués pour un paramètre donné

4.5.3 Résultats de Coombs contrôles positifs

Les tableaux contenant tous les résultats des tests de Coombs effectués durant la partie pratique de ce travail sont répertoriés dans l'annexe 5.

Afin d'obtenir des résultats plus claire, ces résultats ont été comparés puis convertis en pourcentage. Les comparaisons ont été faites sur les critères suivants :

- 1 goutte vs. 4 gouttes dans le tube de départ
- 1er lavage manuel vs. 1er lavage par automate lors des tests de Coombs indirect
- Programme 1 de Medion vs. programme 2 de Medion
- Programme DiaMed vs. programme 1 de Medion
- Programme DiaMed vs. programme 2 de Medion
- Différence de force d'agglutination entre les deux paramètres comparés
- Rapport de force entre les deux paramètres comparés
- Cas de figures les plus souvent observés
- Cas de figure selon le test effectué et le lave globules utilisé
- Cas de figure selon la quantité d'hématies au départ et le lave globules utilisé
- Force d'agglutination selon l'appareil utilisé

Lors de l'analyse des résultats, certains cas de figures se sont distingués. Le tableau suivant se base sur ces cas (résultats de tous les cas de figure en annexe 6).

X	Y	comp. 1 1 goutte vs. 4 gouttes	comp. 2 manuel vs. automate	comp. 3 Medion P1 vs. Medion P2	comp. 4 Diamed vs. Medion P1	comp. 5 Diamed vs. Medion P2
+	+	15.9%	6.6%	15.8%	14.2%	9.0%
++	++	33.0%	45.5%	25.0%	29.5%	30.7%
+	++	10.7%	21.7%	16.8%	11.6%	13.8%
++	+	15.5%	8.6%	13.6%	21.6%	21.7%

Tableau 12. Cas de figures les plus observés

Grâce à ce tableau 12, les observations suivantes ont pu être constatées :

- Pour lacomparaison 1 et 2 près de la moitié des résultats sont identiques.
- Pour les comparaisons 3, 4 et 5 un peu moins de la moitié des résultats sont identiques.
- Pour les comparaisons 1, 3, 4 et 5 un tiers des agglutinations du Coombs contrôle sont identiques et de force ++.
- Pour les comparaisons 4 et 5, les résultats sont assez proches. Les programmes Medion ont toutefois tendance à agglutiner plus fortement que le programme DiaMed.
- Pour la comparaison 3 on remarque que les agglutinations ne sont pas forcément plus fortes avec le programme 1 qu'avec le programme 2.

Le tableau 13, permet de voir la différence de force d'agglutinations selon les situations testées. Comme mentionné précédemment, pour plus de précision, la différence entre + et (+) a été faite. Les différences d'agglutinations ont donc été fait selon le même principe d'où une différence d'une croix entre (+) et +, de deux croix entre (+) et ++ et une différence de trois croix entre (+) et +++.

X vs. Y	Idem	+ de différence	++ de difference	+++ de différence
1 goutte vs. 4 gouttes	51.9%	39.9%	8.1%	-
Manuel vs. Automate	52.1%	43.0%	5.0%	-
Medion P1 vs. Medion P2	46.8%	42.4%	10.9%	-
DiaMed vs. MedionP1	45.3%	40.1%	14.2%	0.5%
Diamed vs. Medion P2	42.3%	46.1%	11.1%	0.5%

Tableau 13. Différence de force d'agglutination

L'analyse de toutes ces comparaisons a permis plusieurs constations. Premièrement, bien qu'il s'agisse de comparaisons de paramètres différents, on observe entre 40 et 50% de résultats avec une force d'agglutination identique (1ère colonne du tableau 13). Deuxièmement, pour environ 40% des cas, la différence entre les deux tests comparés n'est que d'une croix. Au total, il y a donc

entre 80 et 90% des cas où les résultats sont identiques ou quasi identiques (1ère et 2ème colonne du tableau 13).

Le tableau suivant, permet d'étudier le rapport de force entre les deux tests comparés.

X vs. Y	X plus fort que Y	Y plus fort que X
1 goutte vs. 4 gouttes	34.4%	13.6%
Manuel vs. Automate	17.2%	30.8%
Medion P1 vs. Medion P2	24.5%	28.8%
DiaMed vs. MedionP1	37.4%	17.4%
Diamed vs. Medion P2	36.0%	21.7%

Tableau 14. Rapport de force entre les comparaisons

Grâce à ce tableau 14 il a été constaté que :

- Dans un tiers des cas, le rapport de force entre les deux paramètres a démontré qu'une goutte d'hématie dans le tube de départ et que le lave globule DiaMed ont tendance donner des agglutinations plus fortes que les quatre gouttes de départ et les programmes Medion.
- Dans un tiers des cas le 1er lavage effectué à l'aide de l'automate donne des résultats d'agglutinations plus fortes que le lavage fait manuellement.
- Les programmes 1 et 2 de Medion donnent des rapports de forces plus ou moins identiques.

Afin de mieux comprendre l'influence des trois différents programmes sur la force d'agglutination du Coombs contrôle, les tests de Coombs direct avec 1 ou 4 gouttes ont été comparés.

	1 goutte	4 gouttes	Tests de Coombs direct Lave globules		
			Diamed	Medion Programme 1	Medion Programme 2
Idem	(+)	(+)	-	6.7%	2.4%
	+	+	14.9%	26.7%	24.4%
	++	++	34.0%	8.9%	4.9%
	+++	+++	2.1%	-	-
	(+)	+	-	-	4.9%
	(+)	++	2.1%	-	-
	+	(+)	4.2%	15.5%	36.6%
	+	++	10.6%	4.4%	2.4%
	++	(+)	6.4%	13.3%	14.6%
	++	+	21.3%	24.4%	9.7%
	+++	+	2.1%	-	-
	+++	++	2.1%	-	-

Tableau 15. Cas de figure selon le nombre de gouttes et l'appareil utilisé

Il en ressort que :

- Pour le programme DiaMed, environ 50% des cas agglutinent de la même manière (légèrement ou faiblement).
- Pour les programmes 1 et 2 de Medion, un peu moins de 50% des cas agglutinent de manière identique. Ces agglutinations identiques sont souvent faibles.
- Pour tous les programmes, les Coombs contrôles agglutinent mieux lorsqu'une seule goutte d'hématies était présente dans le tube de départ.

Le tableau suivant compare les résultats des 3 programmes DiaMed et Medion aux tests effectués (Coombs direct et indirect avec 1er lavage main ou automate). Il ne tient pas compte du nombre de gouttes d'hématies dans le tube de départ.

				Résultats en %		
	Diamed	Medion P1	Medion P2	Coombs direct	Coombs indirect 1er lavage main	Coombs indirect 1er lavage automate
Idem	(+)	(+)	(+)	1.2	-	-
	+	+	+	9.5	-	-
	++	++	++	5.9	26.5	24.5
	(+)	(+)	+	1.2	-	-
	(+)	+	(+)	3.6	-	-
	(+)	+	+	-	2.0	-
	(+)	+	++	1.2	-	-
	(+)	++	++	-	2.0	-
	+	(+)	(+)	4.1	-	-
	+	(+)	+	4.1	-	-
	+	+	(+)	8.2	-	-
	+	+	++	7.1	4.1	6.1
	+	+	+++	-	-	4.1
	+	++	(+)	1.2	2.0	-
	+	++	+	8.2	2.0	2.0
	+	++	++	1.2	6.1	18.4
	+	++	+++	-	2.0	-
	+	+++	++	-	4.1	-
	+	+++	+++	-	-	2.0
	++	(+)	(+)	8.2	-	-
	++	(+)	+	8.2	-	-
	++	(+)	++	-	4.1	8.2
	++	+	(+)	3.6	-	-
	++	+	+	11.9	10.2	-
	++	+	++	4.1	12.2	20.4
	++	+	+++	-	-	2.0
	++	++	(+)	4.1	2.0	-
	++	++	+	16.7	8.2	2.0
	++	++	+++	-	4.1	4.1
	++	+++	++	-	2.0	-
	++	+++	+++	-	2.0	-
	+++	(+)	(+)	1.2	-	-
	+++	+	+	5.9	2.0	-
	+++	+	+++	-	-	2.0
	+++	++	++	-	-	4.1
	+++	+++	++	-	2.0	-

Tableau 16 . Comparaison des cas selon le test et le programme utilisé

Dans ce tableau on voit que peu de cas de figures ressortent plus que les autres. Il est donc plus difficile à interpréter.

Cas de figures les plus fréquents :

- Le lave globules DiaMed donne des agglutinations avec une croix de plus que les programmes Medion.
- Les lave globules DiaMed et le Medion en programme 1 donnent des agglutinations avec une croix de plus que le programme 2 de Medion.

Autres constatations :

- Pour les deux sortes de Coombs indirect (lavage main ou automate), environ 25% des cas agglutinent de manière identique de force ++.
- Pour le Coombs indirect avec le 1er lavage à la main on constate une légère tendance de l'appareil DiaMed à donner une agglutination un peu plus forte que les résultats des deux programmes Medion.

Le tableau suivant est utile afin de comparer les cas selon leur force d'agglutination par rapport au programme utilisé ou à la quantité de matériel présente dans le tube de départ, sans tenir compte de la sorte de test effectué.

	DiaMed				Medion Programme 1				Medion Programme 2			
	(+)	+	++	+++	(+)	+	++	+++	(+)	+	++	+++
1 goutte	2%	28%	64%	6%	6.1%	49.0%	44.9%	-	18.4%	55.1%	26.5%	-
4 gouttes	10.6%	38.3%	48.9%	2.1%	36.9%	50.0%	13.0%	-	52.4%	40.5%	7.1%	-
Manuel	4%	20%	72%	4%	4.1%	30.6%	55.1%	10.2%	4.0%	20.0%	68%	8.0%
Automate	-	32%	62%	6%	10.0%	34.0%	54.0%	2.0%	2.0%	2.0%	82.0%	14.0%

Tableau 17. Comparaison des forces d'agglutination sans tenir compte de la sorte de test effectué

Les constatations suivantes ont été observées pour le lave globules DiaMed :

- Les forces d'agglutinations se trouvent principalement entre + et ++.
- Les 1 goutte de départ donne des agglutinations plus fortes que les 4 gouttes.
- Les résultats des 1er lavages manuel et automate agglutinent souvent ++.

Pour le programme 1 de Medion :

- Les résultats se trouvent principalement entre + et ++.
- Les 1 goutte de départ donnent des agglutinations plus fortes que les 4 gouttes.
- Les 1er lavages manuel et automate donnent des résultats faibles et légers plus ou moins identiques.
- Les résultats très faibles et forts ont un rapport inversé ; en effet, le lavage manuel donne souvent des agglutinations fortes et le lavage par automate souvent des agglutinations faibles.

Pour le programme 2 de Medion :

- Les résultats semblent plus dispersés.
- Les forces d'agglutination faibles et légères sont le plus représentées.
- Les 1 goutte de départ ont tendance à donner des agglutinations plus fortement que les 4 gouttes.

- Les résultats du 1er lavage effectué par l'automate agglutinent plus que ceux fait à la main.

5. Discussion des résultats

Une partie des objectifs fixés au chapitre 4.1 ont pu être atteints grâce aux différents tests effectués. En effet, les résultats obtenus pour les Coombs contrôles négatifs montrent clairement qu'une trop grande quantité d'hématies rend leur lavage moins efficace et pose un plus grand nombre de problèmes.

La standardisation de la suspension érythrocytaire à 3%, grâce à un étalon visuel, a permis de partir sur les mêmes bases pour chaque test effectué. Cependant, la méthode étant visuel et chaque échantillon de sang étant différent, il est difficile d'obtenir une suspension de 3% régulière.

Les comparaisons entre les résultats de Coombs indirect suite à un 1er lavage exécuté à la main ou par automate ont montrés que la différence entre ces deux modes de lavage était faible.

Pour le lave globules Medion, l'analyse des résultats a démontré que les deux programmes testés sur cet automate étaient plus ou moins équivalents. Toutefois, un plus grand nombre de Coombs contrôle négatifs ont été constatés avec le nouveau programme, ce qui s'explique en grande partie par le fait que la plupart de ces cas étaient des tests effectués avec 4 gouttes d'hématies.

Il faut toutefois prendre garde lors des observations effectuées sur ces résultats. Les cas de Coombs contrôles négatifs ont montrés que les résultats n'étaient pas fiables à cent pour cent (résultats différents pour des tests effectués à partir de la même suspension érythrocytaire et des mêmes réactifs).

6. Conclusion

Il faut préciser qu'avant la mise en place de ce travail de diplôme, le laboratoire avait déjà recherché à comprendre l'origine des Coombs contrôle négatifs. Les tests s'étaient focalisés sur les réactifs et leur conservation. Selon les fabricants le sérum de Coombs et le Coombs contrôle doivent être conservés à une température située entre 2 et 8°C. Ceci n'est pas toujours possible au laboratoire UMT. En effet, les réactifs utilisés au laboratoire des urgences se trouvent à température ambiante 24h/24, tandis que ceux du laboratoire de routine se trouve à température ambiante durant les heures d'ouverture du laboratoire et sont conservés au réfrigérateur durant la nuit. Les tests effectués avaient donc pour but de comparer les résultats des analyses selon la température à laquelle les réactifs étaient conservés. Il en est ressorti que la plupart des résultats étaient semblables. La méthode de conservation des réactifs à l'UMT n'a donc pas été modifiée.

Cependant, l'origine du problème et le fonctionnement des laves globules DiaMed et Medion sont restés mal connus. Ce travail de diplôme a donc permis au laboratoire UMT de mieux comprendre le fonctionnement ces deux automates.

Il est important d'être conscient que les résultats obtenus dans ce travail ne sont pas significatifs. En effet, aucun Coombs contrôle négatif n'a pu être confirmé négatif et la quantité des tests qui ont posés problème par rapport à la totalité des tests est beaucoup trop minime (19 cas sur 700) pour en déduire réellement quelque chose.

Il avait déjà été observé lors du travail quotidien au laboratoire, que la quantité d'hématies mise dans le tube de départ n'était pas la même selon la TAB effectuant l'analyse. Le choix de confronter la quantité indiquée dans le protocole à une quantité excessive d'hématies a permis de constater clairement que 4 gouttes provoque un plus grand nombre de Coombs contrôles négatifs. Il serait toutefois intéressant de poursuivre l'expérience en comparant des quantités plus proches, deux gouttes d'hématies par exemple.

Afin de standardiser la suspension érythrocytaire, un étalon visuel pourrait être introduit au laboratoire. Cependant, comme indiqué auparavant, cet étalon a certaines limites. Étant essentiellement visuel, il sera de toute manière légèrement différent selon la personne effectuant le test. On peut aussi se demander suite aux résultats de Coombs contrôles négatifs obtenus, si un étalon visuel résoudrait réellement une partie du problème. En effet, les tests sortis négatifs puis positif par la suite à partir de la même suspension érythrocytaire et des mêmes réactifs montrent clairement que ni les lavages ni la concentration de la suspension ne sont en cause.

Les 1er lavages lors des tests de Coombs indirects ont montrés qu'ils donnaient des résultats plus ou moins identiques. Cependant, il serait intéressant au niveau du laboratoire de choisir le lavage automatique, car il permettrait une meilleure standardisation des tests. Le lavage manuel, bien que facile à réaliser est effectué par plusieurs personnes différentes, selon la quantité d'NaCl ajouter aux hématies pour les laver et leur mélange, le lavage peut être légèrement différent.

Les deux programmes testés sur l'automate Medion ont montrés qu'ils donnaient des résultats semblables. Le but principal du nouveau programme Medion calqué sur le programme DiaMed, était de diminuer le temps de lavage. Ce but a été atteint, le temps a été diminué de presque la moitié. Cette différence n'est pas négligeable, notamment lorsque les tests doivent être effectués en urgence. Cependant, le programme ne peut pas encore être utilisé au laboratoire, il doit d'abord être validé. Des essais sur les tests de Coombs positifs devraient être réalisés.

De plus, il serait judicieux d'instaurer, dans la maintenance quotidienne des laves globules, un rinçage des têtes de centrifugations afin d'éliminer les petits cristaux d'Immusol et donc de s'assurer de bonne la distribution de la solution dans les tubes.

Les difficultés rencontrées lors de ce travail, ont plutôt été d'ordres techniques. En effet, la mise en place des tests pour 50 donneurs a demandé une très bonne organisation de la partie pratique avant de commencer les expériences. La deuxième difficulté rencontrée à été de rester régulière lors de la lecture des forces d'agglutination. Et enfin, la mise en commun des résultats a été complexe, notamment pour obtenir des tableaux lisibles et faciles à comprendre.

D'un point de vue personnel, j'ai trouvé ce travail intéressant. Il m'a permis de me confronter à un problème quotidien au laboratoire UMT et d'essayer d'y remédier. La partie pratique n'a pas été évidente, le nombre de tubes étant conséquent une bonne maîtrise de la gestion de l'organisation et une grande concentration étaient indispensables.

7. Remerciements

Je tiens à remercier Mme Jocelyne Conne qui m'a suivie et conseillée durant mon travail de diplôme, ainsi que toutes les TAB pour leur collaboration. Je remercie également Mme Alexandra Durrer pour la traduction en anglais du sommaire et Mesdames Marika Vuilleumier et Anna Galvani , représentes Medion et DiaMed, pour leur disponibilité, les réactifs fournis ainsi que les laves globules aimablement prêtés.

8. Annexes

8.1 Lexique

Chimiotaxie	Mouvement d'une cellule ou d'un organisme en réponse à un stimulus chimique. [16]
Cytolyse	Lyse de la cellule, destruction de la cellule.
Effet de zone	Effet observé lors de la présence d'une trop grande quantité d'anticorps, cette quantité empêche les hématies d'agglutiner. Le tests peut paraître négatifs alors qu'en réalité il est positif. Les dilutions du sérum de Coombs IgG permettent de contourner cet effet.
Erythrocyte	Synonyme de globule rouge.
Hématie	Synonyme de globules rouge.
Opsonisation	Processus biochimique par lequel une molécule recouvre la membrane d'une cellule cible pour favoriser sa phagocytose (ingestion de la particule étrangère afin de la détruire). [17]

8.2 Annexe 1 - Protocole Coombs direct utilisé au laboratoire UMT

Test direct à l'antiglobuline humaine

Contexte et objectif

But du document

Ce document fixe les indications et la manière d'effectuer un test direct à l'antiglobuline humaine (TDA), permettant de mettre en évidence des anticorps ou du complément à la surface des hématies.

Il établit la marche à suivre face à un auto-contrôle ou un TDA positif.

Destinataires

Techniciennes en analyses biomédicales (TAB) de l'UMT.

Mode opératoire

Généralités

Toutes les procédures décrites dans cette instruction de travail sont effectuées par une TAB de l'UMT, selon les disponibilités.

Pour plus de détails concernant l'exécution des analyses et l'interprétation des résultats, respectivement les échantillons et réactifs à utiliser, se référer aux documents (1,2).

Les résultats d'analyses sont protocolés sur les listes de travail comme décrit dans le document (3).

Indications

Situations nécessitant un TDA avec recherche de C3d :

- Examen demandé par un client (même si déjà effectué depuis moins de 3 jours)
- Echantillon de donneur (examen demandé par le médecin de l'UCA)
- Echantillon fœtal
- Echantillon de nouveau-né
- Patient devant subir une greffe
- Investigation de réactions transfusionnelles
-

Situations nécessitant un TDA sans recherche de C3d :

- Test prétransfusionnel accompagnant un dépistage d'anticorps irréguliers
- Détermination d'antigènes érythrocytaires par la technique en Coombs indirect
- Titration des anticorps irréguliers
-

Situations nécessitant directement une recherche des spécificités :

- Dernier résultat du TDA positif
- Demande spécifique d'un Coombs IgA
- Présence d'agglutinines froides de spectre thermique > 22°C
- Auto-contrôle positif

Principes

- Pas d'antériorités => sérum de Coombs polyspécifique (avec ou sans C3d selon la situation).

- Résultats positif => détermination des spécificités IgG, -C3d, -IgM, -IgA. Le réactif anti-IgG dilué est utilisé en parallèle (permet de prévenir un effet de zone).
- Résultat(s) positif(s) => analyses supplémentaires :

Spécificité	***Analyses complémentaires***
C3d	Dépistage d'anticorps irréguliers (4)
IgG (seule ou non)	Titre IgG Elution [*1*] (4) Dépistage d'anticorps irréguliers Détermination des sous-classes [2]
IgM ou IgA	Elution [*1*] (4) Dépistage d'anticorps irréguliers (4)

[*1*] : L'élution doit être faite si :
- ◊ Le cas est inconnu.
- ◊ Un nouvel alloanticorps circulant a été mis en évidence.
- ◊ Le titre du TDA a augmenté d'au moins trois dilutions.
- ◊ La dernière demande date de plus de six mois (quel que soit l'évolution du titre de Coombs).
- ◊ La dernière détermination du TDA n'était pas de spécificité IgG.
- ◊ Une hémolyse est suspectée ou que le sérum est très ictérique (dans les cas douteux,
  demander l'avis du médecin de l'UMT).

[2] : Les sous-classes IgG doivent être déterminées lorsque :
- ◊ L'élution est positive.
- ◊ Il s'agit d'un nouveau-né (même si l'élution est négative).

TDA polyspécifique

La technique de référence est la technique en tubes.

La technique en gel ne doit pas être utilisée en routine.

Technique en tubes : Serum de Coombs avec anti-C3d (Medion)

Réactifs spécifiques :

- Sérum de Coombs (polyspécifique)
- Hématies contrôles pour le test de Coombs

Procédure :

1. Laver 3 fois les hématies à tester
2. Préparer une suspension d'hématies à 3-5 % dans du NaCl à 0.9 %
3. Distribuer 2 gouttes de sérum de Coombs et une goutte de suspension érythrocytaire dans un tube
4. Centrifuger, lire
5. Vérifier les résultats négatifs au microscope puis ajouter une goutte d'hématies contrôles
6. Centrifuger, lire
7. Si la réaction est négative, recommencer la procédure
8. Protocoler les résultats.

Technique en tubes : Serum de Coombs sans anti-C3d (Diamed)

Réactifs spécifiques :

- Sérum de Coombs (polyspécifique)
- Hématies contrôles pour le test de Coombs

Procédure :

1. Laver 3 fois les hématies à tester
2. Préparer une suspension d'hématies à 3-5 % dans du NaCl à 0.9 %
3. Distribuer une goutte de sérum de Coombs et une goutte de suspension érythrocytaire dans un tube
4. Centrifuger, lire
5. Vérifier les résultats négatifs au microscope puis ajouter une goutte d'hématies contrôles
6. Centrifuger, lire
7. Si la réaction est négative, recommencer la procédure
8. Protocoler les résultats

Technique en gel

Réactifs spécifiques :

- Cartes Diamed : « LISS-Coombs »
- Diluent Diamed : ID-Diluent 2

Procédure :

1. Mélanger 20 µl de sang total ou 10 µl de concentré érythrocytaire dans 1 ml de diluent 2
2. Distribuer 50 µl de la suspension érythrocytaire dans chaque puits
3. Centrifuger, lire, protocoler les résultats

Spécificité d'un TDA

La seule technique utilisée à l'UMT est la technique en tubes.

Technique en tubes

Réactifs spécifiques :

- Sérum de Coombs (monospécifique)
- Hématies contrôles pour le test de Coombs

Procédure :

1. Laver 3 fois les hématies à tester
2. Préparer une suspension d'hématies à 3-5 % dans du NaCl à 0.9 %
3. Mettre 2 gouttes de sérum de Coombs monospécifique dans un tube et ajouter une goutte de suspension d'hématies
4. Centrifuger, lire, contrôler au microscope les résultats négatifs
5. Si tout est négatif, ajouter une goutte d'hématies contrôles dans le tube « anti-IgG »
6. Centrifuger, lire. Si négatif, recommencer la procédure
7. Protocoler les résultats

Titre d'un TDA IgG

La seule technique utilisée à l'UMT est la technique en tubes.

Technique en tubes

Réactifs spécifiques :

- Sérum de Coombs monospécifique anti- IgG

- Hématies contrôles pour le test de Coombs

Procédure :

1. Laver 3 fois les hématies à tester
2. Préparer une suspension d'hématies à 3-5 % dans du NaCl à 0.9 %
3. Préparer des dilutions géométriques du sérum de Coombs monospécifique IgG avec du NaCl physiologique
4. Distribuer 2 gouttes de sérum de Coombs monospécifique de chaque dilution (jusqu'à 1/128) et une goutte de suspension érythrocytaire dans un tube
5. Mélanger, centrifuger, lire (contrôler les résultats négatifs au microscope)
6. Protocoler les résultats
7. Si le résultat est toujours positif avec une dilution de 1/128, poursuivre les dilutions)jusqu'à 1/2048)

Interprétation

La dernière dilution à laquelle une agglutination est observée donne le titre du test de Coombs.

Détermination des sous-classes IgG

La technique de référence est la technique en gel.

Technique en gel

Réactifs spécifiques :

- Cartes Diamed : « DAT IgG_1/IgG_3 »
- Diluent Diamed : ID-Diluent 2

Procédure :

1. Laver 3 fois les hématies à tester
2. Mélanger 10 µl d'hématies concentrées et lavées dans un ml de diluent 2
3. Distribuer 50 µl de la suspension érythrocytaire dans chaque puits
4. Centrifuger, lire, protocoler les résultats.

Documents liés + références

1. IT - RE - Interprétation des résultats en immuno-hématologie
2. IT - RE - Analyses immuno-hématologiques_réactifs
3. PO - RE - Traçabilité de la demande au résultat d'analyse
4. IT - RE - Recherche et caractérisation des anticorps anti-érythrocytaires

---

GESTION DU DOCUMENT

Auteur(s) : Jocelyne Conne

Validation : janvier 2007

Giorgia Canellini	Lilly Habegger	Jean-Daniel Tissot

Approbation :

Jocelyne Conne

Libération par le service AQ :

Jocelyne Conne	Christel Bonny

8.3 Annexe 2 - Protocole Coombs indirect utilisé au laboratoire UMT

Test de compatibilité majeur

Contexte et objectif

But du document

Détailler la manière d'effectuer les tests de compatibilité, c'est-à-dire la mise en présence du plasma (ou du sérum) du receveur et des hématies du donneur pour permettre de détecter, chez le receveur, des anticorps susceptibles de se fixer sur les hématies du donneur.

Destinataires

Techniciennes en analyses biomédicales (TAB) de l'UMT.

Modifications apportées (par rapport à la version précédente)

- Remplace : IT - RE - Tests de compatibilite_V04

Mode opératoire

Toutes les procédures décrites dans cette instruction de travail sont effectuées par une TAB de l'UMT, selon les disponibilités.

Pour plus de détails concernant l'exécution des analyses et l'interprétation des résultats, respectivement les échantillons et réactifs à utiliser, se référer aux documents (1,2).

Les résultats d'analyses sont protocolés sur les listes de travail comme décrit dans le document (3).

Afin d'observer au mieux la compatibilité, différents points sont à observer :

- Sélection du sang du donneur en fonction des groupes sanguins ABO et Rhésus du receveur
- Sélection d'unités de sang phénotypées lorsque le receveur possède des anticorps irréguliers
- Sérocompatibilité assurée par des tests de compatibilité in vitro entre le sang du donneur et du receveur.

Techniques

Bien que la technique en tubes soit recommandée, les deux techniques (en tubes ou en gel) peuvent être utilisées.

Technique en tubes

Le réactif de Coombs utilisé ne contient pas d'anti-C3d.

Réactifs spécifiques :

- Sérum de Coombs (polyspécifique sans anti-C3d)
- Hématies contrôles pour le test de Coombs
- Solution de Liss
- Sero-contrôle (contrôle positif)

Procédure :

- Deux phases distinctes sont habituellement effectuées :
  1. en milieu Liss modifié, à 37°C
  2. à l'antiglobuline humaine (Coombs indirect)
- Une seule lecture est effectuée

- Un sero-contrôle (sérum contenant des anticorps) doit être effectué une fois par jour par chaque TAB qui effectue des tests de compatibilité et lors d'un changement de lot de réactifs, selon la même procédure (hématies d'un donneur, sero-contrôle comme plasma)
- Le plasma doit être distribué avant les hématies
- Tout test de compatibilité doit être accompagné d'un test direct à l'antiglobuline humaine (4), ou d'une identification d'anticorps avec auto-contrôle.

Marche à suivre :

1. Laver une fois 2-3 gouttes d'érythrocytes
2. Préparer une suspension d'hématies à 3-5 % dans du NaCl à 0.9 %
3. Distribuer dans des tubes en verre : 2 gouttes de plasma
   1 goutte de suspension érythrocytaire
   2 gouttes de Liss
4. Incuber 10-15 min. à 37°C
5. Laver trois fois
6. Ajouter 2 gouttes de sérum de Coombs
7. Centrifuger, lire, protocoler les résultats
8. Ajouter une goutte d'hématies contrôles dans chaque tube négatif
9. Centrifuger, lire
10. En cas de réaction négative, recommencer toute la procédure
11. Protocoler les résultats.

Technique en gel

Réactifs spécifiques :

- Sero-contrôle (contrôle positif)
- Cartes Diamed « Liss - Coombs »
- ID – Diluent 2

Procédure :

- Un sero-contrôle (sérum contenant des anticorps) doit être effectué une fois par jour par chaque TAB qui effectue des tests de compatibilité et lors d'un changement de lot de réactifs, selon la même procédure (hématies d'un donneur, sero-contrôle comme plasma)
- Tout test de compatibilité doit être accompagné d'un test direct à l'antiglobuline humaine (4), ou d'une identification d'anticorps avec auto-contrôle.

Marche à suivre :

1. Mélanger 10 µl de culot érythrocytaire dans 1 ml de diluent 2
2. Pipeter 50 µl de chaque suspension d'hématies dans le puits correspondant
3. Distribuer 25 µl de plasma (sérum) dans chaque puits
4. Incuber 15 min à 37°C
5. Centrifuger, lire, protocoler les résultats

Interprétation

L'absence d'agglutination dans toutes les phases signifie que le sang du donneur est compatible avec celui du receveur.

Les lectures se font macroscopiquement, et les résultats négatifs sont contrôlés au microscope (technique en tubes) lorsque les tests de compatibilité sont effectués pour un patient allo-immunisé.

Un résultat positif après adjonction d'hématies contrôles (technique en tubes) permet de valider un résultat négatif de test de Coombs.

Attitude face à une incompatibilité

La présence d'hémolyse ou d'agglutination (réaction positive) signe une incompatibilité et nécessite une analyse critique des résultats.

Dans ce cas, des analyses complémentaires sont souvent nécessaires (par exemple une recherche d'anticorps irréguliers).

Tous les cas douteux ou difficiles sont à soumettre au médecin de l'UMT.

Documents liés + références

1. IT - RE - Interprétation des résultats en immuno-hématologie
2. IT - RE - Analyses immuno-hématologiques_réactifs
3. PO - RE - Traçabilité de la demande au résultat d'analyse
4. IT - RE - Test direct à l'antiglobuline humaine

GESTION DU DOCUMENT

Auteur(s) : Jocelyne Conne

Validation : janvier 2007

Giorgia Canellini	Jean-Daniel Tissot	Lilly Habegger

Approbation :

Jocelyne Conne

Libération par le service AQ :

Jocelyne Conne	Christel Bonny

8.4 Annexe 3 - Cas de Coombs contrôles négatifs répertoriés par les TAB

Laboratoire	Date	Identification patient	Test effectué	Réactif utilisé	Remarques
Routine	22.12.11	0637617	Coombs direct	Bio-Rad	-
	27.12.11	0637716	Coombs indirect		Sur 4 flacons 1 seul avec le Coombs contrôle négatif
Urgences	25.12.11	0594562	Coombs indirect	Bio-Rad	-
	29.12.11	0594833			-
	30.12.11	0595023			Coombs contrôle négatifs deux fois de suite
	30.12.11	0595023			
	03.01.12	0595256			-
	10.01.12	0595848			Sur 4 flacons 1 seul avec le Coombs contrôle négatif
	10.01.12	0638275			Sur 2 flacons 1 seul avec le Coombs contrôle négatif
	10.01.12	0638275			
	10.01.12	0638275			
	19.01.12	0596624			-
	25.01.12	0639007			-
	27.01.12	0597318			Recherche, 12 cellules, 2 Coombs contrôles négatifs
	30.01.12	0597585			-
	30.01.12	0597587			-

8.5 Annexe 4 – Liste des tubes donneurs

Tube n°	Identification donneur	Aspect du plasma	Groupe	Âge	Sexe
1	H008012000801	normal	A nég	1968	♀
2	H008012006928	normal	A+	1982	♂
3	H008012006899	normal	O+	1964	♂
4	H008012006900	normal	O+	1966	♂
5	H008012006898	normal	O+	1970	♂
6	H008012006920	normal	A nég	1990	♀
7	H008012006889	normal	A+	1945	♂
8	H008012006910	normal	B+	1963	♂
9	H008012006903	normal	A+	1974	♂
10	H008012006918	normal	A+	1956	♂
11	H008012006914	très légérement trouble	A+	1972	♂
12	H008012006930	normal	A+	1960	♂
13	H008012006901	normal	A nég	1985	♂
14	H008012006931	normal	O+	1953	♂
15	H008012006892	normal	O+	1944	♂
16	H008012006907	très légérement trouble	AB+	1963	♂
17	H008012006932	lipémique	B+	1991	♂
18	H008012006915	très légérement trouble	A nég	1961	♂
19	H008012006922	très légérement trouble	A+	1980	♀
20	H008012006923	très légérement trouble	AB+	1964	♂
21	H008012007775	très légérement trouble	A+	1957	♂
22	H008012007776	normal	O+	1947	♂
23	H008012007777	très légérement trouble	A+	1963	♂
24	H008012007779	normal	O nég	1958	♂
25	H008012007782	normal	O+	1950	♂
26	H008012007784	normal	A+	1966	♂
27	H008012008567	normal	O+	1957	♂
28	H008012008568	normal	O+	1961	♂
29	H008012008569	très légérement trouble	O nég	1954	♂
30	H008012008570	très légérement trouble	O nég	1987	♂

Tube n°	Identification donneur	Aspect du plasma	Groupe	Âge	Sexe
31	H008012008572	très légérement trouble	O+	1958	♂
32	H008012008580	très légérement trouble	A+	1993	♀
33	H008012008583	normal	O nég	1953	♂
34	H008012008587	normal	O+	1966	♂
35	H008012008588	normal	A+	1959	♂
36	H008012008590	normal	O nég	1975	♂
37	H008012008593	très légérement trouble	O+	1976	♂
38	H008012008596	normal	O+	1962	♂
39	H008012008595	lipémique	B nég	1985	♂
40	H008012008591	lipémique	O nég	1967	♂
41	H008012008648	légèrement trouble	O+	1943	♂
42	H008012008649	très légérement trouble	B+	1980	♂
43	H008012008652	très légérement trouble	A+	1980	♂
44	H008012008653	très légérement trouble	O nég	1981	♂
45	H008012008654	très légérement trouble	A nég	1981	♂
46	H008012008656	normal	A nég	1944	♂
47	H008012008655	très légérement trouble	O+	1939	♂
48	H008012008658	normal	A+	1953	♂
49	H008012008665	trouble	A+	1965	♂
50	H008012008666	trouble	O nég	1961	♂

8.6 Annexe 5 - Résultats

		Résultats Coombs contrôle								
Tubes n°	Goutte	CD Diamed	CD Medion P1	CD Medion P2	CI Main Diamed	CI Main Medion P1	CI Main Medion P2	CI Autom. Diamed	CI Autom. Medion P1	CI Autom. Medion P2
1	1	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	4	!!!	+	(+)	+			++		
2	1	++	++	++	++	+++	+++	++	++	++
	4	++	++	(+)	++			++		
3	1	++	+	+	++	+	++	+++	+	+++
	4	++	(+)	+	++			++		
4	1	++	++	+	++	++	++	++	++	++
	4	++	++	(+)	++			++		
5	1	++	++	+	++	+	++	+	+++	+++
	4	++	+	!!!	++			++		
6	1	++	++	++	++	(+)	++	++	++	+++
	4	+	+	!!!	++			++		
7	1	++	++	+	+	+++	++	+	++	++
	4	++	(+)	!!!	+			++		
8	1	++	++	+	++	++	++	+	+	+++
	4	++	(+)	!!!	++			+		
9	1	++	++	++	+++	+++	++	++	++	+++
	4	++	+	+	+++			++		
10	1	++	++	+	++	++	++	++	++	++
	4	++	(+)	!!!	+			++		

		Résultats Coombs contrôle								
Tubes n°	Goutte	CD Diamed	CD Medion P1	CD Medion P2	CI Main Diamed	CI Main Medion P1	CI Main Medion P2	CI Autom. Diamed	CI Autom. Medion P1	CI Autom. Medion P2
11	1	++	++	+	++	++	++	+++	++	++
	4	!!!	++	!!!	+			+++		
12	1	++	++	+	++	+++	++	++	!!!	++
	4	++	+	+	++			++		
13	1	++	++	+	+	+	++	++	++	++
	4	++	++	+	++			++		
14	1	++	+	+	+	++	+	++	++	++
	4	+	+	+	++			++		
15	1	+	+	++	+	++	++	++	++	++
	4	+	++	(+)	++			++		
16	1	++	+	++	++	!!!	++	++	+	++
	4	+	+	+	++			++		
17	1	++	(+)	+	++	(+)	++	++	++	++
	4	++	(+)	!!!	+			++		
18	1	++	+	+	++	++	++	+++	++	++
	4	++	+	!!!	++			++		
19	1	+	+	++	++	++	+++	++	(+)	++
	4	+	+	+	++			++		
20	1	++	+	+	+	++	+++	++	+	++
	4	++	(+)	(+)	+			++		

		Résultats Coombs contrôle								
Tubes n°	Goutte	CD Diamed	CD Medion P1	CD Medion P2	CI Main Diamed	CI Main Medion P1	CI Main Medion P2	CI Autom. Diamed	CI Autom. Medion P1	CI Autom. Medion P2
21	1	++	+	+	+	+++	++	++	+	+++
	4	+	+	(+)	+			++		
22	1	++	+	+	++	+	++	++	++	++
	4	(+)	+	(+)	++			++		
23	1	++	++	+	++	++	++	++	(+)	++
	4	+	!!!	(+)	++			++		
24	1	+++	+	+	++	+	++	++	(+)	++
	4	++	!!!	(+)	++			++		
25	1	++	++	+	++	+	+	++	++	++
	4	++	+	(+)	++			++		
26	1	++	++	+	+	++	(+)	++	+	++
	4	+	+	(+)	++			++		
27	1	++	(+)	(+)	++	++	++	++	+	++
	4	(+)	(+)	+	++			+++		
28	1	+	+	!!!	++	++	++	++	++	++
	4	++	+	+	++			++		
29	1	+	+	+	++	+	+	++	+	++
	4	++	!!!	+	+			++		
30	1	+++	+	+	++	++	++	+	++	++
	4	+++	(+)	(+)	++			++		

		Résultats Coombs contrôle+								
Tubes n°	Goutte	CD Diamed	CD Medion P1	CD Medion P2	CI Main Diamed	CI Main Medion P1	CI Main Medion P2	CI Autom. Diamed	CI Autom. Medion P1	CI Autom. Medion P2
31	1	++	!!!	++	++	++	++	+	+	++
	4	!!!	(+)	(+)	++			+++		
32	1	++	+	(+)	++	++	+	++	+	++
	4	+	(+)	+	++			++		
33	1	++	+	+	++	+	+	++	++	+
	4	++	(+)	+	++			++		
34	1	+	++	++	++	+	+	+	++	++
	4	++	(+)	(+)	++			++		
35	1	+++	+	+	++	+	++	++	+	++
	4	+	!!!	+	++			+		
36	1	++	++	+	(+)	+	++	+	+	++
	4	+	(+)	+	+			++		
37	1	++	++	+	+	+	++	+	++	++
	4	+	(+)	(+)	++			+		
38	1	+	+	+	++	++	+++	+	++	++
	4	+	(+)	(+)	++			+		
39	1	+	+	+	++	+	++	+	+	+++
	4	++	(+)	+	++			+		
40	1	(+)	(+)	(+)	+	++	++	+	++	++
	4	++	(+)	(+)	++			+		

		Résultats Coombs contrôle								
Tubes n°	Goutte	CD Diamed	CD Medion P1	CD Medion P2	CI Main Diamed	CI Main Medion P1	CI Main Medion P2	CI Autom. Diamed	CI Autom. Medion P1	CI Autom. Medion P2
41	1	+	+	++	++	++	++	++	(+)	++
	4	+	+	+	++			++		
42	1	+	++	+	+	++	++	++	++	++
	4	++	+	(+)	++			++		
43	1	++	+	+	++	++	(+)	+	+	++
	4	(+)	+	++	++			++		
44	1	+	++	+	++	++	+	+	++	++
	4	+	+	(+)	++			++		
45	1	++	++	++	++	++	++	++	+	++
	4	++	+	++	+			++		
46	1	+	+	++	(+)	++	++	+	++	++
	4	+	+	++	+			++		
47	1	++	+	+	++	+	+	++	+	++
	4	+	+	(+)	+			++		
48	1	+	+	++	++	++	+	+	++	+
	4	(+)	+	(+)	+			++		
49	1	+	++	+	++	++	+	+	++	++
	4	(+)	+	(+)	+			++		
50	1	+	+	+	+++	+	+	++	+	++
	4	+	++	+	+			+		

8.7 Annexe 6 - Totalité des cas de figures de Coombs contrôle positifs

	X	Y	1 goutte vs. 4 gouttes	manuel vs. automate	Medion P1 vs. Medion P2	Diamed vs. Medion P1	Diamed vs. Medion P2
Idem	(+)	(+)	1.7	-	4.9	1.1	2.1
	+	+	15.9	6.6	15.8	14.2	9.0
	++	++	33.0	45.5	25.0	29.5	30.7
	+++	+++	1.3	-	1.1	0.5	0.5
	(+)	+	1.7	0.5	3.8	2.6	0.5
	(+)	++	0.4	2.0	3.3	0.5	1.6
	+	(+)	10.3	1.0	3.3	2.1	4.8
	+	++	10.7	21.7	16.8	11.6	13.8
	+	+++	0.4	1.0	2.2	1.6	2.1
	++	(+)	6.4	1.5	5.4	9.5	5.8
	++	+	15.5	8.6	13.6	21.6	21.7
	++	+++	0.4	5.6	2.7	1.1	3.7
	+++	(+)	-	-	-	0.5	0.5
	+++	+	0.9	0.5	-	2.6	1.6
	+++	++	1.3	5.6	2.2	1.1	1.6

8.8 Annexe 7 - Paramètres Medion

8.8.1 Paramètres globaux [15]

Volume Adjust	Valeur de correction du volume de remplissage du sérum Physiologique. 0 = pas de correction du volume de remplissage
Rotor 24 places	Nombre de place disponible dans le rotor
Shakings	Nombre d'agitations
Susp. Agit.	Nombre de secousses après la préparation d'une suspension
D.SpinDown	Activer ou désactiver la possibilité de réglage du paramètre de programme DSpinDown
SuspensionM.	Activer ou désactiver la possibilité de réglage du paramètre de programme SalSusp/ml (n'est utile que quand on fait une suspension)
Agit.SpinM	Activer ou désactiver la possibilité de réglage du paramètre de programme Agit.Spin
SpinDecantM.	Activer ou désactiver la possibilité de réglage du paramètre de programme SpinDecant

8.8.2 Paramètres de programme [15]

Cycle	Nombre de cycle de lavage
SalWash (ml)	Volume de remplissage du sérum physiologique par tube
Wash (rpm)	Vitesse de rotation pour la marche de la centrifugeuse pendant un cycle de lavage
TWash (sec)	Durée de la centrifugation d'un cycle de lavage
Decant (rpm)	Vitesse de rotation lors de la décantation pendant un cycle de lavage
DSpinDown	Activer ou désactiver le cycle de centrifugation nécessaire pour séparer les gouttes sur la paroi des tubes
Agit.Spin	Activer ou désactiver l'agitation qui a lieu avant le cycle de centrifugation destiné à la réaction d'agglutination
Spin (rpm)	Vitesse de rotation pour la centrifugation pour la réaction d'agglutination
Tspin (sec)	Durée de centrifugation pour la réaction d'agglutination
SpinDecant	Activer ou désactiver la décantation après le cycle de centrifugation pour la réaction d'agglutination

9. Références bibliographiques

[1] Ma vie ton sang, Organisation, Le Service Régional Vaudois de Transfusion Sanguine (SRTS VD), [page web], Accès : http://www.mavietonsang.ch/vaud/index.php?option=com content&view=article&id=7&Itemid=7 (page consultée le 23.01.2012)

[2] Service de transfusion sanguine CRS, Principe d'immuno-hématologie et analyses pré-transfusionnelles chez le patient, recommandations de l'ASMT et du STS CRS à l'attention du personnel de laboratoire et des établissements de soin, [polycopié], version 2, mise à jour le 15.08.2009

[3] G.Canellini, J.Conne, J.-D. Tissot, S.Waldvogel, *Immunohématologie, base de médecine transfusionnelle*, [polycopié], cinquième édition, mise à jour août 2010

[4] A.Chambaz, Travail de diplôme, *Test de Coombs direct vs. autocontrôle en Coombs indirect*, ESsanté, [polycopié], avril 2008

[5] G.Sébahoun, *Hématologie clinique et biologique*, [livre], Rueil-Malmaison, Arnette 2ème édition, 2005

[6] J.Conne, *Test direct à l'antiglobuline humaine*,[protocole de laboratoire], UMT, janvier 2007

[7] J.Conne, *Test de compatibilité majeur*,[protocole de laboratoire], UMT, janvier 2007

[8] Immusol, Notice notée sur la bouteille d'Immusol

[9] Medion Diagnostics, *Enlisst-II*, [notice], Düdingen, 2006

[10] Bio-Rad, *Coombs-Serum IgG*, [notice], Cressier, 2010

[11] Medion Girofls Diagnostics, *Coombs control*, [notice], Düdingen, 2010

[12] Bio-Rad, Products, Instrumentation, Instrumentd for DiaMed conventional techniques, DiaCent - CW, [page web], Accès : http://www.diamed.ch/product_detail.aspx?id=615&navvis =yes (page consultée le 10.01.2012)

[13] DiaMed, *Mode d'emploi centrifugeuse lave-globules DiaCent – CW*, [mode d'emploi], Cressier, 2ème édition, 1998

[14] Medion Dagnostics, Products, Centrifuges, *DAC III*, Düdingen, 2006, [page web], Accès : http://www.medion-diagnostics.ch/e/zentrifugen.htm (page consultée le 10.01.12)

[15] Medion Diagnostics, *DAC III mode d'emploi*, [mode d'emploi], Düdingen, 2010

[16] Larousse, *Chimiotaxie*, [page web], Accès : http://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/chimiotaxie/15353 (page consultée le 02.04.2012)

[17] Wikipédia, Opsonisation, 04.03.2012 [page web], Accès : http://fr.wikipedia.org/wiki/Opsonisation (page consultée le 02.04.2012)

10. Table des illustrations

Image de la page titre :

- Lave globules Diamed (idem Fig. 13)
- Lave globule Medion (idem Fig. 16)

Fig.1 ***Schéma personnel***
Synthèse de plusieurs schémas

Fig.2,3 ***Anticorps de type IgM et IgG***
Beltina.org, encyklopedia of health , *Immunoglobulin-what is and definition*, [page web], Accès : http://www.beltina.org/health-dictionary/ immunoglobulin-a-d-e-g-m-ida-igd-ige-igg-igm-therapy.html (page consultée le 20.03.12)

Fig.4 ***Voie classique de la cascade du complément***
Simplification du schéma du cours d'immunohématologie G.Canellini, J.Conne, J.-D. Tissot, S.Waldvogel, *Immunohématologie, base de médecine transfusionnelle*, [polycopié], cinquième édition, mise à jour août 2010

Fig.5,6 ***Test de Coombs direct et test de Coombs indirect***
Wikipédia, Hémagglutination, *Schéma explicatif du test direct et indirect à l'antiglobuline*, [page web], Accès : http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier: Coombs_test_ schematic_fr.png (page consultée le 19.01.12)

Fig. 7 ***Potentiel zêta***
Tout sur la transfusion, Spécial immuno-hématologie érythrocytaire, *Potentiel zêta*, 2011, [page web], Accès : [http://www.toutsurlatransfusion. com/immuno-hematologie/anticorps/potentiel-zeta.php]

Figure 8 ***Serum de Coombs***
DiaMed, Instrumentation, Test sera and reagents for conventional techniques, Antihuman globulin sera, *Coombs-Serum IgG*, [page web], Accès : http://www.diamed. ch/product_detail.aspx?id=483&navvis=yes (page consultée le 24.01.2012)

Fig.9,10,11,12 ***Image résultats de Coombs et Coombs contrôle***
Austin Community College, *Unit 6 Grading Agglutination Reactions*, [page web], Accès : http://www.austincc.edu/mlt/bb/Grading%20Agglutination %20Reactions.jpg (page consultée le 20.03.12)

Fig.13 ***Lave globule Medion***
Bio-Rad, Products, Instrumentation, Instrumentd for DiaMed conventional techniques, DiaCent - CW, [page web], Accès : http://www.diamed.ch/product_detail.aspx?id= 615&navvis =yes (page consultée le 10.01.2012)

Fig.14,15,17,18 ***Schéma personnel***

Fig.16 ***Lave globule Medion***
Medion Dagnostics, Products, Centrifuges, *DAC III*, Düdingen, 2006, [page web], Accès :
http://www.medion-diagnostics.ch/e/zentrifugen.htm
(page consultée le 10.01.12)

Fig.19 ***Forces d'agglutinations***
Austin Community College, *Unit 6 Grading Agglutination Reactions*, [page web], Accès : http://www.austincc.edu/mlt/bb/Grading%20Agglutination%20Reactions.jpg (page consultée le 20.03.12)

Life's blood, *Granding reactions*, [page web], Accès :
http://faculty.matcmadison.edu/mljensen/BloodBank/lectures/Basic_Laboratory_techniques&Reagents.htm